

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR**

GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Paracoccidioides brasiliensis*: CARACTERIZAÇÃO DO GENE/cDNA E ANÁLISE FUNCIONAL DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.

Candidata: Mônica Santiago Barbosa

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

**Tese apresentada ao Departamento de
Biologia Celular do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de Brasília
como requisito parcial à obtenção do grau
de Doutor em Biologia Molecular**

Brasília - DF- Brasil

-2007-

TRABALHO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, DO INSTITUTO
DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.

APOIO FINANCEIRO: CAPES/ CNPq/ SECTEC-GO

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dr. Augusto Schrank

Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília

Prof. Dr. Jaime Martins de Santana

Instituto de Ciências Biológicas , Universidade de Brasília

Profa. Dra. Maristela Pereira

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

SUPLENTE

Profa. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

Profa. Dra. Sonia Nair Bão

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

*“É importante fazer o que se gosta,
e melhor ainda é gostar do que se faz,
e só se arrepender
dos riscos não encarados”*

Érico Veríssimo

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida...

...aos meus pais Francisco e Ivanilde por me orientarem no grandioso projeto, chamado “vida”. Obrigada pelos ensinamentos, dedicação, compreensão e carinho. Se hoje cheguei até aqui é porque vocês me deram este privilégio. Admiro-os muito!

...as minhas amadas irmãs Rosana e Silvana, pelo incentivo, conselhos e apoio incondicional.

Dedico ainda ao meu Dudu...

Esta conquista também se deve a você, que esteve ao meu lado em todos os momentos. A
você, que me ofereceu sempre o melhor através do olhar de apoio, de sua palavra de
incentivo, de seu gesto de compreensão, de sua atitude de segurança, mesmo quando me
veio desânimo. Nos momentos importantes suportou minha ausência; nos dias de fracasso,
respeitou meus sentimentos. Obrigada por caminhar ao meu lado! Obrigada pela paciência
e principalmente por me amar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela benção diária, pelo privilégio concedido e por me proporcionar momentos difíceis que foram fundamentais para meu amadurecimento.

Um agradecimento especial, a minha orientadora Célia, pelos ensinamentos, empenho e compromisso com o bem público. Obrigada pela confiança, mais uma vez depositada, no meu trabalho, tendo em vista que foi minha orientadora de monografia e de mestrado. Célia para mim, você é a tradução de competência, disciplina e profissionalismo. Teus ensinamentos me dirigiram pela vida profissional e me deram as asas que precisava para voar. Muito obrigada!

A grande amiga Cinthia Ferreira, um obrigado mais que especial, por incentivar-me e apoiar-me no decorrer desses anos. Você sabe o quanto foi importante para essa conquista. Amiga, você é a pessoa mais companheira que já conheci. Conviver com você tornou-me uma pessoa melhor.

Aos amigos Rodrigo (meu estagiário do coração) e Ronney (Braziiiiiiiiil) por transformarem todos os momentos em “bons momentos”. Ninguém pode ter idéia do quanto foi importante nosso trio fantástico, nos momentos de sufoco, piadas, ansiedade e descontração. Amigos foi um prazer inigualável o nosso convívio durante esse período. Amo vocês.

Ao Claytim e Alexandre pela preciosa amizade, pelo apoio e por transformarem os inúmeros dias de angústia em Brasília em momentos agradáveis.

Ao Fabinho, pela estada em Brasília. Fabinho você é a pessoa que posso afirmar, amigo por toda a vida, afinal já se passaram doze anos de amizade e muitos ainda estão por vir.

A querida amiga Rosália pelas palavras carinhosas, pela torcida e pelo exemplo de pessoa.

À professora Maristela Pereira pela colaboração e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos professores Alfredo Góes (UFMG), Maria José Mendes Giannini (UNESP), e Sônia Nair Bão (UnB), pela colaboração nesse trabalho, e pela receptividade em seus laboratórios.

A banca examinadora, pela disponibilidade de contribuição para o trabalho.

Aos amigos: Anginho, Valzinha e Roberto, pela agradável convivência.

Ao querido Luiz, meu irmão de laboratório. Obrigada pela importantíssima troca de experiências.

Aos queridos amigos do LBM: Nathalie, Sabrina, Cristina, Milce, Bernadete, Patrícia Lima, Sarah, Nadia, Bruno, Kelly, Moniquinha, Elisa, Mirele, Wesley, Juliana Parente, Fafá, Mariana, e aos amigos do grupo Maris, pela boa convivência, apoio e colaboração.

A todos, muito obrigada!

PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO DOUTORADO

1- Artigos Publicados em Periódicos

1- Barbosa, Mônica Santiago; Passos, Daniela Araujo Cunha; Soares, Maria Sueli Felipe; Jesuino, Rosália Santos Amorim; Pereira, Maristela; Soares, Célia Maria de Almeida. **The Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is differentially regulated in phases of *Paracoccidioides brasiliensis*: Molecular and phylogenetic analysis.** Fungal Genetics and Biology, Estados Unidos, v. 41, n. 7, p.667-675, 2004.

2- Soares, Maria Sueli Felipe; Andrade, Rosangela Vieira; Arraes, Fabricio; Nicola, Andre M; Maranhão, Andrea Queiroz; Torres, Fernando Araripe; Pereira, Ildinete Silva; Fonseca, Marcio J Poças; Campos, Elida G; Moraes, Lidia Maria Pepe; Andrade, Patricia A; Tavares, Aldo H F P; Silva, Simoneide S; Kyaw, Cynthia M; Souza, Dioge P; Network, Pgenome; Pereira, Maristela; Jesuino, Rosália Santos Amorim; Andrade, Edmar Vaz De; Parente, Juliana Alves; Oliveira, Gisele Silva De; Barbosa, Mônica Santiago; Martins, Natália F; Fachin, Ana L; Cardoso, Renato S; Passos, Geraldo A S; Almeida, Nalvo F; Walter, Maria Emília M T; Soares, Célia Maria De Almeida; Carvalho, Maria Jose A; Brigido, Marcelo de Macedo. **Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells.** Jornal of Biological Chemistry, Estados Unidos, v. 280, p. 24706-24714, 2005.

3-Barbosa, Mônica Santiago; Bao, Sonia Nair; Andreotti, Patricia Ferrari; Faria, Fabricia Paula de; Soares, Maria Sueli Felipe; Feitosa, Luciano dos Santos; Giannini, Maria José Soares Mendes; Soares, Célia Maria de Almeida. **Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells.** Infection and Immunity, American Society for Microbiol, v. 74, p. 382-389, 2006.

4- Pereira, Luiz Augusto , Sônia Nair Bão , Mônica Santiago Barbosa , Juliana Leal Monteiro da Silva , Maria S.S. Felipe, Jaime Martins de Santana , Maria José Soares Mendes-Giannini , Célia Maria de Almeida Soares. **Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* Triosephosphate Isomerase suggests the potential for adhesin function.** FEMS Yeast Research (*in press*).

5- Castro, Nadya Silva, Mônica Santiago Barbosa, Zilma Alves Maia, Sonia N. Bão, Jaime Santana, Maria S. S. Felipe. Maria José M. Giannini, Maristela Pereira, Célia Maria de Almeida Soares. **Characterization of the glycosylated cell-wall defective for filamentous growth protein of *Paracoccidioides brasiliensis* (PbDfg5p).** Yeast (em revisão).

6- Santos, Mônica Oliveira, Mônica Santiago Barbosa, Sonia Nair Bão, Maria Sueli Soares Felipe, Luciano S. Feitosa, Cirano José Ulhoa, Célia Maria de Almeida Soares. **Characterization of the N-acetyl- β -D-glucosaminidase from *Paracoccidioides brasiliensis* and its expression in *Escherichia coli*.** FEMS Microbiology Letters. (Submetido).

2- Trabalhos Apresentados Em Eventos

1- Barbosa, M. S., Santos, R. S., Bão, Sonia Nair, Andreotti P., F, Faria, Fabricia Paula de, Felipe, M. S. S., Feitosa, L., S, Mendes Giannini., M. J. S, Soares, C. M. A. **The Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein and is related to the fungus adhesion to extracellular matrix protein and to the interaction with cells.** X Congresso Brasileiro de Biomedicina., 2006, Goiânia.

2- Santos, R. S., Lima, P. S., Silva, M. G., Bailao, E. F. L. C., Bailão, A. M., Borges, C. L., Barbosa, M. S., Soares, C. M. A. **Identificação e Caracterização de Antígenos do Fungo Patogênico Humano *Paracoccidioides brasiliensis***. X Congresso Brasileiro de Biomedicina., 2006, Goiânia.

3- Santos, R. S., Barbosa, M. S., Zancope-Oliveira, R. M., Felipe, M. S. S., Soares, C. M. A. **The Antigenic protein of 36 kDA From *Paracoccidioides brasiliensis*: Heterologous expression, Purification and Immunological reactivity with patient serum**. X Congresso Brasileiro de Biomedicina., 2006, Goiânia.

4- Tomazett, P. K., Barbosa, M. S., Faria, Fabricia P.de, Bão, Sonia Nair, Felix, C. R., Soares, C. M. A., Pereira, M. **Expressão Heteróloga, Citolocalização e Atividade Enzimática de B-1,3-glucana sintase de *Paracoccidioides brasiliensis***. III Congresso de Ensino Extensão e Pesquisa (CONPEEX) da UFG, 2006, Goiânia..

5- Santos, R. S., Barbosa, M. S., Zancope-Oliveira, R. M., Soares, C. M. A. **Imunoreatividade da Proteína recombinante Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase do Fungo Patogênico Humano *Paracoccidioides brasiliensis***. II Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão - CONPEEX, 2006, Goiânia.

6- Barbosa, Mônica Santiago; Santos, Rodrigo S.; Felipe, Maria Sueli Soares; Oliveira, Rosely Maria Zancope; Soares, Célia Maria de Almeida. **Heterologous expression, purification and immunological reactivity of the recombinant glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Paracoccidioides brasiliensis***. In: IX INTERNATIONAL MEETING ON PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS, 2005, Águas de Lindóia- SP. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2005. v. 47, p. 35.

7- Barbosa, Mônica Santiago; Bao, Sonia Nair; Andreotti, Patricia; Felipe, Maria Sueli Soares; Feitosa, Luciano dos Santos; Giannini, Maria Jose Mendes; Soares, Célia Maria de Almeida. **The glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein and is related to the fungus adhesion**. In: IX XI

INTERNATIONAL MEETING ON PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS, 2005, Águas de Lindóia- SP. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2005. v. 47, p. 44-44.

8- Arraes, F B M; Pereira, Maristela; Andrade, E V; Jesuino, Rosália Santos Amorim; Simoes, IC; Teixeira, M M; Bailão, Alexandre Melo; Silva, G; Parente, Juliana Alves; Oliveira, Juliana Camargos de; Barbosa, Mônica Santiago; Castro, Nadya Silva; Pbgnomenetnetwork; Soares, Célia Maria de Almeida; Brigido, Marcelo M; Felipe, Maria Sueli Soares. **Metabolic analysis of the transcriptome from the fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis***. In: XXIV REUNIAO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 2004.

9- Barbosa, Mônica Santiago; Carneiro, Lilian Carla; Soares, Maria Sueli Felipe; Passos, Daniela Araujo Cunha; Jesuino, Rosália Santos Amorim; Pereira, Luiz Augusto; Pereira, Maristela; Faria, Fabricia Paula de; Soares, Célia Maria de Almeida. **Identification and recombinant expression of antigens from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis***. In: THE 15TH CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY, 2003, San Antonio - Texas. ISHAM. 2003.

10- Moreira, Sabrina Fonseca Ingenito; Bailão, Alexandre Melo; Jesuino, Rosália Santos Amorim; Barbosa, Mônica Santiago; Passos, Daniela Araujo Cunha; Soares, Maria Sueli Felipe; Bão, Sonia Nair; Pereira, Maristela; Soares, Célia Maria de Almeida. **Molecular Characterization of a Catalase from *Paracoccidioides brasiliensis***. In: THE 15TH CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY, 2003, San Antonio, Texas. 2003.

11- Barbosa, Mônica Santiago; Soares, Maria Sueli Felipe; Jesuino, Rosália Santos Amorim; Pereira, Maristela; Soares, Célia Maria de Almeida. **Molecular and phylogenetic analysis and heterologous expression of a Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis***. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2003, Florianópolis. 2003. v. 1, p. 79.

3- Co- orientação de Monografias de Conclusão de Curso:

Rodrigo da Silva Santos. **Caracterização imunológica da proteína recombinante gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase do fungo patogênico humano *Paracoccidioides brasiliensis***. Período: 2004-2006. Universidade Católica de Goiás.

Natalie Martelli de Paula. **Expressão heteróloga e purificação da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Paracoccidioides brasiliensis***. Período: 2006-2007. Universidade Católica de Goiás.

4- Participação em Bancas de Monografia de Conclusão de Curso:

Ana Lúcia Soares da Silva e Pâmela Kalyenna Duarte. **Métodos de transformação de plantas**. Centro Universitário de Goiás- Uni-Anhaguera.

Adriana Ramos Tavares e Sulemar Maria Lima de Moraes. **Papiloma vírus humano em mulheres do município de Goiânia, Goiás**. Centro Universitário de Goiás- Uni-Anhaguera.

5- Palestra e Mini- cursos Ministrados em Eventos Científicos

Palestra: **Diagnóstico Molecular de Micoses**. Ministrada na I Semana de Genética e Biologia Molecular da Faculdade Padrão. Realizada no período 27 a 30 setembro de 2006.

Mini-curso: **Clonagem Molecular e suas Aplicações na Indústria**. Ministrado na Semana Integradora de Agronomia - Biologia – Química do Centro Universitário de Goiás- Uni-Anhaguera. Realizada no período de 29 a 31 de maio 2007.

Mini-curso: **Diagnóstico Molecular**. Ministrado no II Encontro de Biologia da Faculdade Araguaia (II-Enbiara). Realizada no período de 07 a 12 de maio de 2007.

SUMÁRIO

RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVII

CAPÍTULO I

I-INTRODUÇÃO

I.1 – O FUNGO <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	18
I.1.1– Aspectos Gerais.....	18
I.1.2– Dimorfismo.....	20
I.2– MATRIZ EXTRACELULAR.....	27
I.3 –MOLÉCULAS DE ADESÃO EM FUNGOS.....	29
I.4– ADESINAS DE <i>P. brasiliensis</i>	34
I.5 – GLICERALDEÍDO -3-FOSFATO DESIDROGENASE (GAPDH).....	35
I.5.1 – Considerações gerais.....	35
I.5.2 – Funções da enzima GAPDH.....	36
I.5.3 – GAPDH como adesina.....	36
I.5.4 –GAPDH como antígeno.....	38
I.5.5– GAPDH de <i>P. brasiliensis</i>	38
II- JUSTIFICATIVA.....	40
III- OBJETIVOS.....	41

CAPÍTULO II

ARTIGOS PUBLICADOS.....	42
-------------------------	----

CAPÍTULO III

ARTIGOS PUBLICADOS EM COLABORAÇÃO NO PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO DOUTORADO.....	43
---	----

CAPÍTULO IV

IV.1- DISCUSSÃO.....	44
IV.2-PERSPECTIVAS.....	48

CAPÍTULO V

V.1- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
V.2- ANEXOS.....	60

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. Além disso, patógenos utilizam suas moléculas de superfície para se ligar a componentes da matriz extracelular para estabelecer a infecção. Uma proteína antigênica de *P. brasiliensis* foi isolada de gel de eletroforese bidimensional de proteínas totais do fungo e caracterizada. Peptídeos foram obtidos da proteína de 36 kDa e pI 6.8 e mostraram homologia com gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH: EC 1.2.1.12) de diversos organismos. O cDNA completo e o gene que codificam para PbGAPDH foram obtidos e ambos contém uma ORF que codifica para uma proteína com 338 aminoácidos que apresenta todos os peptídeos caracterizados na PbGAPDH nativa. O gene *Pbgapdh* contém 5 exons interrompidos por 4 introns. Análises realizadas com a PbGAPDH deduzida sugerem sua utilidade em prover relações filogenéticas, como também evidenciaram a correlação entre a filogenia e as posições dos introns nos genes cognatos. A expressão de *Pbgapdh* foi analisada e uma única espécie de mRNA de 2.0 Kb, preferencialmente expressa na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* foi detectada em concordância com os altos níveis de expressão da proteína. A proteína recombinante GAPDH foi utilizada para produção de anticorpo policlonal em coelho. Por microscopia imunoeletrônica e análises por *Western blot*, foi detectada a presença da GAPDH, na parede celular de leveduras de *P. brasiliensis* e no citoplasma. A GAPDH recombinante foi capaz de se ligar a fibronectina, laminina e colágeno do tipo I. Uma observação importante, é que tanto o tratamento de *P. brasiliensis* com anticorpo anti-GAPDH, quanto de pneumócitos tratados com a GAPDH recombinante, promoveram a inibição da aderência e internalização de *P. brasiliensis* à células cultivadas *in vitro* (pneumócitos). Essas observações indicam que a GAPDH possivelmente contribui para a adesão do microrganismo aos tecidos do hospedeiro e para a disseminação da infecção.

Palavras chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, adesina.

Capítulo I

Introdução Geral

I - INTRODUÇÃO

I.1- O FUNGO *Paracoccidioides brasiliensis*

I.1.1 - Aspectos Gerais

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo dimórfico, patógeno humano e agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica geograficamente restrita a América Latina (**Restrepo & Tobón, 2005**). O Brasil é responsável por 80% dos casos descritos na literatura, seguido por Colômbia e Venezuela (**Coutinho et al., 2002**). Os estados das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste são no Brasil, os locais onde a doença é mais frequentemente encontrada (**Paniago et al., 2003**).

Este fungo se desenvolve como levedura nos tecidos infectados ou quando cultivado *in vitro* a 36° C, e como 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**).

O fungo *P. brasiliensis* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, subdivisão Eufungi, classe Plecomycetes, subclasse Eufungi, ordem Onygenales, família Onygenaceae, subfamília Onygenaceae Anamórficos, gênero *Paracoccidioides*, espécie *Paracoccidioides brasiliensis* (**San-Blas et al., 2002**). Recentemente, **Matute et al., (2006)** descreveram a existência de três diferentes espécies filogenéticas de *P. brasiliensis*: S1

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis, an important human pathogen causing 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 gel after two dimensional electrophoresis and characterized. Endoproteinase Lys-C-digest peptides of the purified protein, which presented a molecular mass of 36 kDa and pI 6.8, were subjected to sequence analysis of their amino acids, that revealed strong homology to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH: EC 1.2.1.12) from several sources. The complete cDNA and gene encoding PbGAPDH were obtained and both contained an open reading frame predicted to encode a 338 amino acid protein that presented all the peptides characterized in the native PbGAPDH. The *Pbgapdh* gene contained 5 exons interrupted by 4 introns. Analysis performed with the deduced PbGAPDH suggested its usefulness in providing phylogenetic relatedness, as well as evidenced the correlation between the phylogeny provided by the deduced proteins and introns positions in the cognate genes. The expression of *Pbgapdh* was analyzed and a single species of mRNA, of 2.0 Kb, preferentially expressed in the yeast parasitic phase of *P. brasiliensis*, was detected in agreement to the high levels of the GAPDH expression in the yeast cells of *P. brasiliensis*. The purified recombinant GAPDH was used to produce polyclonal antibody in rabbit. By immunoelectron microscopy and Western blot analysis, GAPDH was detected in the cell wall and the cytoplasm of the yeast phase of *P. brasiliensis*. The recombinant GAPDH was found to bind to fibronectin, laminin, and type I collagen in ligand far-Western blot assays. Of special note, the treatment of *P. brasiliensis* yeast cells with anti-GAPDH polyclonal antibody and the incubation of pneumocytes with the recombinant protein promoted inhibition of adherence and internalization of *P. brasiliensis* to those in vitro cultured cells. These observations indicate that GAPDH could be contribute to the adhesion of the microorganism to host tissues and to the dissemination of infection.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis* ; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; adhesion

(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**).

A organização genômica de *P. brasiliensis* ainda não está totalmente esclarecida; isso se deve principalmente ao fato de não se conhecer a fase sexual ou telemórfica do fungo. Durante as últimas décadas, com o avanço das metodologias moleculares, vários aspectos foram elucidados, mas conclusões definitivas a respeito da composição genética de *P. brasiliensis* ainda estão longe de serem alcançadas. Nesse sentido, vários estudos foram realizados, utilizando diferentes metodologias. Através da técnica de gel em eletroforese de pulso alternado (PFGE), foi possível identificar 4 ou 5 cromossomos com 2-10 Mb tanto de fungos isolados do meio ambiente, quanto de isolados clínicos, desta maneira, estima-se que *P. brasiliensis* apresente um genoma variando entre 23-31 Mb (**Feitosa et al., 2003**). Utilizando a técnica de citometria de fluxo (FCM), **Almeida et al (2007)** realizaram estudos com 10 isolados de *P. brasiliensis*, incluído representantes das três espécies recentemente identificadas, o que permitiu sugerir que o fungo apresenta um genoma variando de 26,3 a 35,5 Mb por célula de leveduras uninucleadas, ao passo que o genoma dos conídeos apresentou um tamanho de 30,2 a 30,9 Mb, não apresentando nenhuma diferença significativa com a forma de levedura.

O nicho ecológico exato de *P. brasiliensis* ainda não está bem definido. No entanto, algumas hipóteses são propostas. Acredita-se que o fungo viva na natureza, em ambientes de água fresca, tais como rios ou córregos. Outra hipótese propõe que o fungo viva saprobicamente e de forma temporária no solo. Reforçando essa hipótese o fungo foi

isolado de duas espécies de tatus, o *Dasytus novemcintus* e o *Cabassou centralis* (**Corredor et al., 2005**).

P. brasiliensis alcança o hospedeiro, usualmente através da via respiratória, por inalação de propágulos do micélio, como conídios. Nos pulmões esses propágulos se convertem para a fase leveduriforme, de onde podem disseminar-se para diferentes órgãos e tecidos (**San Blas et al., 2002**).

As manifestações clínicas da PCM são diversas, podendo apresentar desde lesões pulmonares assintomáticas até infecções generalizadas. 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 (**Mendes-Giannini et al., 1994; Lenzi et al., 2000**).

I.1.2 - Dimorfismo

O fungo *P. brasiliensis* apresenta dimorfismo térmico, ou seja, a característica de alternar-se entre duas formas morfológicas, em resposta a ambientes hostis. 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 (**Kurokawa et al., 1998; San-Blas et al., 2002**).

A temperatura é um dos estímulos mais notórios no dimorfismo do fungo *P. brasiliensis*, que se apresenta como micélio a 22°C-25°C e como levedura a 35°C-37°C (**San-Blas, 2002**). Fatores nutricionais também podem interferir no processo dimórfico de *P.*

brasiliensis. A adição de soro fetal de bezerro à meio de cultura complexo e quimicamente definido permitiu preservar a expressão fenotípica de leveduras, a 25° C (Villar *et al.*, 1988).

Outro fator que foi relacionado ao dimorfismo de *P. brasiliensis* é a presença do hormônio feminino 17- β -estradiol. O hormônio inibe *in vitro* e *in vivo* a transição de micélio para levedura, de maneira dose-dependente, sendo esse fato relacionado como possível fator de proteção à infecção em mulheres (Restrepo *et al.*, 1984; Sano *et al.*, 1999).

Silva *et al.*, (1994) caracterizaram *in vitro* o processo de diferenciação do isolado *Pb* 01 (ATCC-MYA-826), objeto de estudo do presente trabalho. A diferenciação de micélio para levedura, e o inverso, ocorrem em 20 e 15 dias, respectivamente, 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.

Visto 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, foi alvo de estudo de diferentes grupos. Nesse sentido, Silva *et al.* (1994), avaliaram a transição celular no isolado *Pb* 01, caracterizada por alterações na síntese de proteínas durante os estágios iniciais do processo de diferenciação. Cunha *et al.* (1999), detectaram proteínas diferencialmente expressas em *P. brasiliensis*. Particularmente, destacam-se a *PbM46* similar à enolases (46 kDa, presente em maior quantidade na fase miceliana) e *PbY20* (proteína de 20 kDa presente somente na fase leveduriforme). O gene codificante para a *PbY20* foi caracterizado; a análise comparativa da seqüência deduzida de aminoácidos mostrou identidade alta da *PbY20* com flavodoxinas, que são proteínas que se ligam à coenzima FMN (flavina mononucleotídeo), transferindo elétrons (Daher *et al.*, 2005).

Fonseca et al. (2001), através de estudos de imunoproteômica, caracterizaram seqüências parciais de aminoácidos dos antígenos catalase, frutose-1-6-bifosfato aldolase, malato desidrogenase, triose fosfato isomerase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, todos preferencialmente expressos na forma leveduriforme de *P. brasiliensis*. Os genes correlatos foram posteriormente caracterizados e, como previsto, apresentaram expressão diferencial durante a transição dimórfica do fungo (**Moreira et al., 2004; Pereira et al., 2004; Barbosa et al., 2004; Carneiro et al., 2005**). Além disso, os genes codificantes das proteínas HSP70 (**Silva et al., 1999**), HSP60 (**Salem-Izacc et al., 2001**), ClpB (**Jesuino et al., 2002**), manosiltransferase (**Costa et al., 2002**), apresentam baixos níveis de expressão na forma miceliana, quando comparados com a forma de levedura de *P. brasiliensis*, sugerindo que estas proteínas sejam necessárias para sobrevivência do fungo nas condições térmicas do hospedeiro e que possam desempenhar papel na morfogênese de *P. brasiliensis*.

O Projeto Genoma Funcional e Diferencial de *P. brasiliensis*, desenvolvido por pesquisadores da região Centro-Oeste do Brasil, resultou no seqüenciamento de 6.022 genes expressos nas fases miceliana e leveduriforme do isolado *Pb* 01, possibilitando a detecção de genes diferencialmente expressos (**Felipe et al., 2003; 2005**). A diferenciação celular em *P. brasiliensis* requer mudança na temperatura, o que pode ser associado com a resposta ao estresse. Dessa forma, foram identificados 48 transcritos codificando chaperonas ou proteínas envolvidas no processo de estresse, sendo oito desses transcritos diferencialmente expressos. A análise do transcriptoma também revelou alguns prováveis componentes das vias de sinalização e seqüências gênicas consideradas como potenciais alvos para drogas antifúngicas em *P. brasiliensis*, não possuindo nenhum homólogo no genoma humano, como: quitina deacetilase, isocitrato liase e α -1,3-glicana sintase, todos preferencialmente expressos na fase leveduriforme.

Outro projeto Genoma Funcional foi desenvolvido por pesquisadores do Estado de São Paulo, que identificaram 4.692 genes do isolado *Pb18*. Através da análise de ESTs, **Goldman et al. (2003)**, identificaram vários genes potenciais de virulência em *P. brasiliensis* homólogos à *C. albicans*. Os genes da via de transdução de sinal foram implicados na transição dimórfica. A identificação de alguns genes de *P. brasiliensis* homólogos aos genes envolvidos na via de transdução de sinal e relacionados à virulência de *C. albicans*, sugere que esta via possa estar atuando em *P. brasiliensis*, provavelmente controlando a diferenciação celular. **Marques et al. (2004)**, utilizando biblioteca de subtração e microarranjos, identificaram genes preferencialmente expressos na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* (isolado *Pb18*), proporcionando maiores informações acerca da patobiologia deste fungo. Dentre os genes identificados como diferencialmente expressos estão α -1,3-glucana sintetase, enzima relacionada ao metabolismo de parede celular; ERG25 que codifica uma C-4 esterol metil oxidase e atua no primeiro passo enzimático da síntese de ergosterol em fungos, além de genes envolvidos no metabolismo de enxofre, tais como metionina permease. A análise do transcriptoma de *P. brasiliensis* durante a transição dimórfica é atualmente objeto de estudo de pesquisadores (**Nunes et al., 2005; Bastos et al., 2007**).

Nunes et al. (2005), através de microarranjos de DNA avaliaram 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 entre esses, genes que codificam 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 *P. brasiliensis*. Durante a transição da fase miceliana para leveduriforme de *P. brasiliensis* verificou-se a expressão alta do gene que codifica para uma 4-hidroxil-fenil-piruvato dioxigenase (4-HPPD), proteína envolvida no catabolismo de

aminoácidos. Este gene pode ser inibido pela adição de NTBC [2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoi)-ciclohexane-1,3-dione], assim como por seus derivados. A inibição de 4-HPPD provoca o bloqueio do crescimento e da diferenciação para a fase leveduriforme do fungo *in vitro*.

A via da biossíntese do enxofre foi amplamente estudada em fungos (Marzluf, 1997; Thomas & Surdin-Kerjan, 1997; Paszewski *et al.*, 2000). Recentemente, a análise da expressão de genes envolvidos na utilização de enxofre foi realizada em *P. brasiliensis* (Andrade *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2006). Neste estudo, os autores caracterizaram a expressão de cinco genes envolvidos no metabolismo do enxofre (CDI1-cisteína dioxigenase, MEP1-metionina permease, CHS1-colina sulfatase, APS1-APS kinase, SUR1-sulfito redutase) e avaliaram o acúmulo de RNAm destes genes durante a transição de micélio para levedura e crescimento da fase leveduriforme. Todos os cinco genes avaliados neste estudo apresentaram um alto acúmulo de RNAm durante a transição dimórfica e durante o crescimento da fase leveduriforme, sugerindo que nestas situações estão ocorrendo mobilização e armazenamento de enxofre, além da ativação da via de assimilação inorgânica. Os autores sugerem que, embora *P. brasiliensis* não use enxofre inorgânico como única fonte para iniciar a transição e o crescimento da fase leveduriforme, este fungo pode de algum modo, utilizar ambas, as vias orgânica e inorgânica durante o processo de crescimento. Estes estudos forneceram novas informações sobre o comportamento transcricional de vários genes envolvidos no metabolismo do enxofre.

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 celulares mostraram-se aumentados durante a diferenciação celular de micélio para levedura após 22 horas de indução da transição, sugerindo que *P. brasiliensis* favorece o remodelamento da membrana e de parede celulares

nos estágios iniciais da morfogênese. Neste estudo, genes envolvidos na via de assimilação do enxofre como a sulfito redutase, mostraram-se super expressos durante a transição, sugerindo o envolvimento do metabolismo do enxofre durante o processo de diferenciação em *P. brasiliensis*, como descrito anteriormente. Durante a transição também foi verificada a presença de enzimas que participam do ciclo do glicoxalato, como a isocitrato liase, malato desidrogenase, citrato sintase e aconitase. A presença destes transcritos durante a diferenciação indica que esta via é funcional durante esse processo. Também foram identificados genes envolvidos em vias de transdução de sinal tais como MAPK, serina/treonina quinase e histidina quinase, sugerindo que a transição morfológica em *P. brasiliensis* é mediada por vias de transdução de sinal que controlam a adaptação ao ambiente para a sobrevivência e adaptação do fungo dentro do hospedeiro.

Com o objetivo de estudar genes possivelmente envolvidos na adaptação e sobrevivência de *P. brasiliensis* no hospedeiro durante a infecção, **Bailão et al. (2006)**, utilizaram a Análise de Diferença Representacional de cDNA (cDNA-RDA) para identificar genes de *P. brasiliensis* induzidos durante o processo infectivo e em condições que mimetizam a via hematológica de disseminação fúngica. No modelo de infecção experimental foi observada a alta frequência do transcrito *zrt1* (zinco/ferro permease). O mesmo foi observado para o transcrito *ctr3*, codificando um transportador de cobre de alta afinidade, que sugere a exigência de uma permease cobre/ferro para o transporte do Fe. Em adição, o transcrito codificante para a glutamina sintase (*gln1*) foi fortemente induzido após incubação com sangue humano sugerindo que a remodelação na parede/membrana celular possa ser um dos meios pelos quais *P. brasiliensis* responda às mudanças de osmolaridade externa encontrada pelo fungo na via de disseminação sanguínea. Recentemente, **Bailão et al. (2007)**, analisaram genes preferencialmente expressos em leveduras de *P. brasiliensis* tratadas com plasma humano, simulando assim sítios de infecção, com inflamação. Foi observado um

aumento significativo na expressão de transcritos super regulados, associados com a degradação de ácido graxos, síntese de proteínas envolvidas no remodelamento da parede celular e síntese de proteínas relacionadas à mudança de osmolaridade. Assim como na incubação com sangue, a glutamina sintase também é super expressa na condição de incubação com plasma, reforçando a hipótese já descrita anteriormente de que a super expressão desta enzima esteja ligada ao aumento da síntese de quitina que ocorreria durante o estresse osmótico. As análises comparativas dos perfis de genes super regulados durante a incubação com plasma e com sangue demonstraram que aproximadamente 16,6% dos transcritos super regulados encontrados no fungo quando na presença de plasma humano não estavam presentes no sangue, sugerindo a influência das células sanguíneas no perfil transcricional previamente descrito por **Bailão et al. (2006)**.

Tavares et al. (2007), realizaram experimentos de hibridização em microarranjos de DNA, nos quais foi possível definir transcritos de *P. brasiliensis*, isolado *Pb01*, internalizados em macrófagos de origem murino. Este fungo possui inúmeros processos adaptativos ao hospedeiro em resposta à fagocitose. Após a internalização, o patógeno promove adaptação metabólica induzindo a expressão de genes da biossíntese de aminoácidos, especificamente genes envolvidos na biossíntese de metionina, além de diversos genes relacionados ao estresse como, por exemplo, a superóxido dismutase 3, Hsp60 e QCR8 (subunidade do citocromo oxidase c).

Recentemente, o transcriptoma de *P. brasiliensis*, fase leveduriforme, recuperado de fígado de animais experimentais (camundongos B10) foi descrito por **Costa et al. (em revisão)**. Foram seqüenciadas 4.932 ESTs no processo infectivo, sendo 37,47% relacionadas a novos genes e 23,75% pertencentes a genes super expressos. Os genes identificados foram categorizados em processos metabólicos, transporte celular e energia. Do total de ESTs geradas neste estudo, 65,53% das seqüências identificadas, também estavam presentes no

transcriptoma de levedura e micélio de células obtidas de cultura *in vitro*, descrito por **Felipe et al. (2005)**. A demonstração do perfil gênico das células leveduriformes de *P. brasiliensis* recuperadas de animais infectados é um requisito essencial para o estudo do genoma funcional de modo a esclarecer os mecanismos de patogenicidade e virulência fúngica.

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 é importante para as interações célula a célula e fornece um substrato às células para aderirem e proliferarem, modulando diretamente a forma e funções celulares. 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 900 kDa, presente na membrana basal e nos pulmões. Esta glicoproteína pode ser exposta quando o tecido sofre um dano, que pode ser provocado por toxinas bacterianas, drogas ou por processo inflamatório. A interação com laminina é crucial para vários processos biológicos, os quais requerem adesão celular, tais como, diapedese, coesão celular dentro do tecido, metástase de células cancerosas e infecções (**Beck et al., 1990**). De fato, receptores de laminina, foram descritos em células que normalmente interagem com a membrana basal, tais como células epiteliais ou endoteliais, células musculares e neurais. Células que extravasam da corrente sanguínea, como por exemplo,

macrófagos, leucócitos e células tumorais, também podem exibir esses receptores (**Bouchara, 1997**).

Fibronectina é uma glicoproteína dimérica de 440 kDa, presente na forma solúvel no plasma sanguíneo e outros fluidos corporais e na forma fibrilar na MEC. A fibronectina provavelmente atua como molécula de adesão em células de mamíferos, um processo que envolve a ligação de receptores específicos da superfície celular com domínios presentes na molécula de fibronectina (**Mohri et al., 1996**).

Colágeno é o principal constituinte da MEC e representa um importante alvo para adesão de muitas espécies de microrganismos. Vários tipos de colágeno foram caracterizados, colágeno tipo IV é encontrado principalmente na membrana basal e colágeno tipo I é abundante na matriz intersticial (**Gil et al., 1996**).

Vários fungos de importância clínica, como *P. brasiliensis* (**Mendes-Giannini et al., 2000**); *C. albicans* (**Filler, 2006**); *Histoplasma capsulatum* (**McMahon et al., 1995**), *Cryptococcus neoformans* (**Ganendren et al., 2006**) *Pneumocystis carinii*, (**Kottom et al., 2003**), *Sporothrix schenckii*, (**Figueiredo et al., 2004**); *Penicillium marneffeii* (**Srinoulprasert et al., 2006**) *Blastomyces dermatitidis* (**Brandhorst et al., 2003**) *Coccidioides immitis* (**Hung et al., 2002**) e *Fonsecaea pedrosoi* (**Limongi et al., 2003**) são capazes de aderir à proteínas da MEC. A adesão implica que o patógeno reconheça carboidratos ou proteínas ligantes na superfície da célula do hospedeiro ou proteínas constituintes da membrana basal (**Patti et al., 1994**). O grande número de tecidos que os fungos podem colonizar e infectar sugere que eles possuem uma variedade de moléculas de superfície para adesão (**Sullivan et al., 2004**). A adesão de microrganismos patogênicos à tecidos do hospedeiro é considerada indispensável para o início da colonização e futura disseminação.

I.3- MOLÉCULAS DE ADESÃO EM FUNGOS

Várias moléculas de adesão foram estudadas em fungos recentemente, visto que a adesão de microrganismos às proteínas da MEC é o primeiro passo para o estabelecimento do processo infectivo. Em *C. albicans*, uma família gênica denominada ALS (Agglutinin-Like Sequence), é composta de pelo menos oito genes, que codificam para um grupo de adesinas do fungo (Filler *et al.*, 2006). Als1p e Als3p foram capazes de promover adesão do fungo às células endoteliais e epiteliais, bem como às proteínas da MEC. 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 adesão em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) e células de epitélio bucal (BEC) (Zhao *et al.*, 2004; Sheppard *et al.*, 2004). Resultados similares foram observados, com as adesinas Als2p e Als4p (Zhao *et al.*, 2005). O gene *EAPI* (Extracellular adherence protein) de *C. albicans* foi isolado como uma provável adesina de parede celular. A análise funcional do gene foi avaliada em *Saccharomyces cerevisiae* (*flo8Δ*); essa cepa apresenta capacidade menor de adesão, quando comparada com a selvagem. O mutante de *S. cerevisiae* (*flo8Δ*) transformado com o gene *EAPI*, recuperou a capacidade de aderir às placas de polietileno, bem como às células epiteliais HEK (Human embryonic kidney cell line 293) (Li & Palecek, 2003).

Manoproteínas são componentes da parede de fungos, e desempenham um importante papel na relação parasito-hospedeiro. Algumas manoproteínas favorecem a adesão do fungo à superfície das células do hospedeiro. Em *C. albicans* uma manoproteína de 65 kDa (MP65), a qual codifica para uma provável β -glicanase, 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 placa de polietileno. Outra evidência foi

mostrada quando mutante de *C. albicans*, o qual não expressa MP65 na parede celular, apresentou menor capacidade de adesão, quando comparada com a cepa parental (**Sandini et al., 2007**).

Uma grande parte das infecções provocadas por *Candida* sp está relacionada com a formação de biofilmes na superfície de dispositivos médicos, como cateteres. Esses biofilmes são constituídos por uma comunidade estruturada de células aderentes à uma superfície inerte e constitui uma forma de proteção ao desenvolvimento do fungo, fomentando relações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis (**Nobile et al., 2006**). A aderência é uma propriedade crítica para a formação de biofilmes, e, como esperado, muitas moléculas de adesão podem atuar na formação dessas estruturas. Nesse sentido, algumas adesinas de *C. albicans* previamente descritas, como Hwp1 (Hyphal wall protein), Als3 (Agglutinin-like sequence) e Eap1p (eIF4E-associated protein) foram estudadas, e mostraram papel na adesão do fungo às células do hospedeiro e na formação de biofilmes de *C. albicans* (**Nobile et al., 2006; Li et al., 2007**).

Em *A. fumigatus*, duas proteínas de parede celular de 37 e 72 kDa apresentaram capacidade de ligação à laminina; outros dois peptídeos de massa molecular de 23 e 30 kDa foram capazes de interagir com fibronectina (**Penalver et al., 1996; Tronchin, et al., 1997**).

Foi proposto que a habilidade de *H. capsulatum* interagir com laminina seja 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 laminina 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 anticorpo anti-proteína de 50 kDa e o peptídeo IKVAV, presente na molécula de laminina foram capazes de inibir a adesão do fungo à molécula de laminina. Para avaliar se as cadeias de

oligossacarídeos estariam envolvidas no processo de adesão, realizou-se o tratamento de laminina com N-acetil-lactosamina. Nenhuma evidência foi observada sobre o envolvimento dos carboidratos presentes na molécula de laminina com a ligação de *H. capsulatum* (McMahon *et al.*, 1995).

A atividade da fosfolipase foi correlacionada como a aderência de diversos patógenos às células epiteliais. Recentemente foi demonstrado que a fosfolipase B1 (PBL1) é um fator de virulência de *C. neoformans*, requerido no início da criptococose pulmonar (Santangelo *et al.*, 2004). A enzima multifuncional Pbl 1, degrada dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), o principal componente do fluido surfactante presente nos pulmões. A deleção do gene PBL1 inibiu significativamente a capacidade de adesão de *C. neoformans* às células epiteliais do pulmão (linhagem A549). Embora a fosfolipase não seja considerada uma molécula de adesão clássica, os autores enfatizam a forte correlação entre a atividade da PBL1 e a adesão de *C. neoformans* ao tecido pulmonar (Ganendren *et al.*, 2006).

P. carinii é um fungo que causa pneumonia severa em pacientes imunocomprometidos. A ligação de *P. carinii* às células do epitélio alveolar e às proteínas da matriz extracelular é considerada um ponto crucial para o início da infecção. O gene STE20, identificado através de técnicas de hibridização subtrativa é expresso diferencialmente durante adesão do fungo ao tecido pulmonar. Esse gene, além de estar relacionado ao crescimento de hifas, está envolvido no processo de adesão do fungo à células do epitélio pulmonar e aos constituintes da matriz extracelular, como fibronectina, vitronectina e colágeno, favorecendo a invasão do fungo ao tecido do hospedeiro (Kotton *et al.*, 2003).

Sporothrix schenckii é o agente etiológico da esporotricose, uma micose subcutânea, que ao acometer indivíduos imunocomprometidos, 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* e proteínas da MEC foi avaliada através de experimentos de competição, entre peptídeos presentes na molécula de fibronectina e laminina. Foi sugerido que os peptídeos RGD (presente na fibronectina) e YIGSR (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).

Peniciliose é uma micose causada pelo fungo *P. marneffei*, a qual apresenta diferentes manifestações clínicas como febre, anemia, perda de peso, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. A habilidade de *P. marneffei* em iniciar a infecção foi relacionada à capacidade de adesão dos seus esporos às moléculas da MEC e tecido epitelial pulmonar. Experimentos de adesão, demonstrou a participação de uma proteína de 20 kDa, caracterizada como um ligante de laminina e fibronectina, potencialmente relevante no processo de adesão de *P. marneffei* ao tecido hospedeiro (Srinoulprasert *et al.*, 2006).

B. dermatitidis é o agente etiológico da blastomicose, uma infecção respiratória que acomete indivíduos e animais no mundo inteiro. A patogênese dessa micose é pouco compreendida; acredita-se que a patogenicidade de *B. dermatitidis* seja atribuída à capacidade do fungo em aderir aos tecidos do hospedeiro. Em *B. dermatitidis* a adesina melhor estudada é uma glicoproteína de 120 kDa (WI-1), caracterizada como BAD1. Foi demonstrado que BAD1 está presente na superfície de *B. dermatitidis*, possivelmente mediando a ligação do fungo a macrófagos humanos, esse processo é dependente do nível de expressão de BAD1, apresentado por diferentes isolados de *B. dermatitidis*. O anticorpo anti-BAD1 inibe a ligação da levedura a macrófagos, enquanto microesferas de plástico revestidas com BAD1 purificada, aumentam a adesão à macrófagos, reforçando assim a propriedade adesiva de BAD1. Através de ferramentas de manipulação genética, foi avaliado o papel de BAD1 na adesão e virulência de *B. dermatitidis* em modelo animal (BALB/C). Camundongos

infectados com *B. dermatitidis* cepa selvagem (ATCC 26199), desenvolveram blastomicose disseminada letal, semanas após a inoculação, ao passo que camundongos infectados com a mesma dose de inóculo do fungo que continha o gene BAD1 mutado (cepa 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 (**Brandhorst et al., 2003; Nemecek et al., 2006**).

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 presente na parede externa de esporos (*SOWgp*). Ensaio *in vitro*, com a proteína recombinante (rSOWp) mostraram que esta se liga à laminina, fibronectina e colágeno. A deleção do gene *SOWgp* resultou na perda parcial da capacidade dos esporos em se ligar às proteínas da MEC, bem como uma significativa redução da virulência em camundongos, quando os mesmos foram infectados com *C. immitis* que continha a mutação para o gene *SOWgp*.

F. pedrosoi é um patógeno humano, causador da cromoblastomicose, uma micose subcutânea de distribuição mundial. Através de estudos realizados com extratos protéicos de conídeos de *F. pedrosoi* foi possível identificar uma adesina de 50 kDa, caracterizada como uma lectina ligadora de manose e N-acetil-D-glicosamina de células epiteliais (**Limongi et al., 2001**).

I.4 - ADESINAS DE *P. brasiliensis*

P. brasiliensis é capaz de aderir, atravessar e invadir barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro (**Mendes-Giannini et al., 2000**). Foi demonstrado que a capacidade de aderência e invasão do fungo é dependente da virulência do isolado (**Hanna et al., 2000**). Estudos

caracterizaram componentes da matriz extracelular envolvidos na interação de *P. brasiliensis* com o hospedeiro. A laminina é uma das moléculas que promovem a adesão de *P. brasiliensis*, facilitando a sua patogenicidade. Estudos *in vivo* mostraram um aumento da infecção intratesticular de hamster, quando os animais foram infectados com *P. brasiliensis* previamente recoberto com laminina de origem murina (Vicentini *et al.*, 1994). A primeira adesina descrita em *P. brasiliensis* foi a glicoproteína de 43 kDa, com a capacidade de interagir com laminina; foi demonstrado que a interação da gp 43 à laminina foi inibida *in vivo* e *in vitro* por anticorpos anti-gp43 (Gesztési *et al.*, 1996). Recentemente foi evidenciada a interação da gp43 com a fibronectina, um outro componente associado à matriz extracelular (Mendes-Giannini *et al.*, 2006).

Outras moléculas de adesão em *P. brasiliensis* foram descritas. Uma adesina de 30 kDa isolada de *P. brasiliensis*, tem capacidade de ligação à laminina, mas não a outros componentes da MEC. A adesão de *P. brasiliensis* foi intensamente inibida pelo pré-tratamento das células epiteliais com a molécula de 30 kDa (Andreotti *et al.*, 2005). *P. brasiliensis* também apresentou 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. A proteína de 32 kDa, apresentou homologia com proteínas de funções hipotéticas de *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* e *Neurospora crassa*. Ensaio utilizando 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 (Gonzalez *et al.*, 2005).

Os mecanismos pelos quais *P. brasiliensis* adere e invade a célula do hospedeiro, ainda não são bem compreendidos. A via de transdução de sinal envolvendo proteínas tirosina quinase (PTK) e fosfatases pode modular eventos cruciais durante a infecção fúngica. Neste sentido, foi investigado o envolvimento da PTK na aderência e invasão de *P. brasiliensis* às

células epiteliais. A inibição da invasão do fungo foi observada quando células epiteliais foram tratadas com genisteína, que é inibidor específico de tirosina quinases. Esses resultados sugerem que a PTK participa da via de transdução de sinal, durante o evento inicial do processo de adesão e invasão de *P. brasiliensis*, às células epiteliais (Monteiro *et al.*, 2007).

No ciclo biológico de *P. brasiliensis*, as leveduras são expostas ao hospedeiro, portanto suas proteínas de superfície são candidatas a antígenos, a moléculas de adesão, entre outros. Recentemente foi descrito em nosso laboratório moléculas de superfície que apresentaram a capacidade de aderir às proteínas da MEC, como Dfg5p (Castro *et al.*, 2007 em revisão), triose fosfato isomerase (Pereira *et al.*, *in press*) e, em particular, a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que possui um provável papel nos primeiros estágios da infecção e foi objeto de estudo desta tese (Barbosa *et al.*, 2006).

I.5 - GAPDH

I.5.1 – Considerações gerais

GAPDH (E.C 1.2.1.12) é uma enzima que participa da via glicolítica e da gliconeogênese, desempenhando papel no catabolismo e anabolismo de carboidratos. Essa enzima é um homotetrâmero e catalisa a reação de oxidação da gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-bifosforoglicerato, usando o NAD⁺ como coenzima (Baynes & Dominiczak, 2000). A GAPDH é constituinte da família de proteínas, que desempenha um papel multifuncional, em diferentes localizações celulares, além do seu bem caracterizado papel na glicólise (Sirover, 1999).

I.5.2 – Funções da enzima GAPDH

A GAPDH é usada como modelo para análises de estrutura de proteínas e mecanismos enzimáticos. O gene foi utilizado como protótipo para estudos de organização gênica, expressão e regulação. Entretanto, estudos recentes, demonstraram que a GAPDH de mamíferos desempenha um quadro complexo de funções não relacionadas com a via glicolítica, incluindo transporte e fusão de membranas, ligação a microtúbulos, atividade fosfotransferase, exportação de RNA nuclear, replicação e reparo de DNA (**Singh & Green *et al.*, 1993**). Outras investigações sugerem ainda que a GAPDH esteja envolvida em apoptose, câncer de próstata, patogênese viral e doenças neurodegenerativas relacionadas à idade (**Hara *et al.*, 2005**). As diferentes funções que a GAPDH de mamíferos desempenha, está relacionada à localização celular e a estrutura que a molécula pode assumir. No citoplasma, GAPDH é um tetrâmero e está envolvida na via glicolítica podendo também se ligar ao RNA, enquanto que no núcleo, GAPDH é um monômero envolvido no reparo de DNA (**Mazzola & Sirover *et al.*, 2005**).

No núcleo, GAPDH desempenha uma função semelhante a uracil DNA glicosilase (UDG), enzima envolvida no mecanismo de reparo do DNA. UDG remove do DNA a uracila que resulta da deaminação espontânea da citosina (**Meyer-Siegler *et al.*, 1999**). A função da GAPDH como ativadora da transcrição foi proposta. GAPDH ativa o promotor da histona 2B, por associar-se ao fator de transcrição Oct-1; esse fator de transcrição co-ativa o complexo OCA-S, que é essencial para transcrição da histona 2B. Consistente com essa função, GAPDH foi descrita, ligada ao DNA fita simples no núcleo de neurônios, possivelmente atuando como ativadora da transcrição (**Morgenegg *et al.*, 1986; Zheng *et al.* 2003**). Foi proposto, ainda, que GAPDH atua na proliferação celular. Como descrito anteriormente

GAPDH ativa o promotor da histona 2B, proteína requerida para progressão da fase S do ciclo celular. Outra evidência que reforça essa função foi o acúmulo da proteína GAPDH e do seu transcrito observados no núcleo de células em divisão (Zheng *et al* 2003). GAPDH foi a primeira enzima da via glicolítica, descrita como associada à tubulina; é sabido que GAPDH modula a estrutura do citoesqueleto por promover o empacotamento de microtúbulos (Cueille *et al.*, 2007). A GAPDH presente no citoplasma regula a tradução protéica, ligando-se a seqüências específicas como às regiões não traduzidas (untranslated regions ou UTR) ricas em adenina–uracila (AU) na extremidade 3' do RNA mensageiro de linfocina, bem como nas regiões UTR da extremidade 5' do DNA do vírus de hepatite A e 3' do genoma do vírus da influenza humana tipo I (Dollenmaier & Weitz, 2003).

A função da GAPDH como molécula mediadora na morte celular está relacionada ao estresse oxidativo. Nesse contexto, GAPDH é ativada pelo óxido nítrico (ON), uma das principais moléculas sinalizadoras envolvidas na morte celular. Durante o estresse oxidativo, induzido por ON, a cisteína presente no sítio ativo da GAPDH é nitrosilada. A GAPDH modificada se liga à proteína Siah1 (uma ligase ubiquitina E3) estabilizando-a. O complexo GAPDH/Siah estável é translocado para o núcleo, uma vez que Siah apresenta peptídeo sinal de endereçamento nuclear. No núcleo GAPDH/Siah degrada proteínas, induzindo citotoxicidade, o que ocasiona a morte celular (Mokoto *et al.*, 2005).

Foi sugerido que GAPDH desempenha um papel em várias doenças neurodegenerativas, mas os eventos moleculares ainda não são compreendidos. Na doença de Alzheimer e Parkinson, GAPDH foi imunoreativa. Foi também observado um acúmulo da GAPDH no núcleo de neurônios em apoptose. Fato interessante é que a GAPDH se liga a várias proteínas responsáveis por desencadear doenças neurodegenerativas, como proteína precursor a β -amilóide, mas o papel da GAPDH na interação ainda não está claro (Shalova *et al* 2007).

O gene da GAPDH é diferencialmente expresso em muitos tipos de tumores, como câncer renal, de próstata e de mama; enquanto o nível de expressão é reduzido por drogas utilizadas em quimioterapia. Foi sugerido que a GAPDH desempenhe papel no início da formação de tumores, mas os mecanismos moleculares ainda não foram esclarecidos. Pode-se especular razões que expliquem esta expressão alterada, como um aumento crítico na atividade metabólica de células que sofrem transformação maligna, tais como um aumento na demanda energética, com a conseqüente necessidade de mais atividade de GAPDH, entre outras enzimas glicolíticas. É certo que as enzimas celulares podem ter suas funções reguladas no nível protéico, sem necessidade de maior expressão gênica. Mas, muito provavelmente, ao se promover um aumento excessivo da demanda funcional, em função de proliferação celular no tumor, outras maneiras de atender às novas necessidades são utilizadas. Entre elas, inclui-se o aumento na expressão gênica, na estabilidade do RNAm, e na eficiência da tradução protéica. No entanto, outras hipóteses não podem ser descartadas, no caso da possível razão do aumento de expressão de GAPDH. Uma delas é de que os oncogenes são capazes de ativar direta ou indiretamente elementos responsivos à hipóxia, presentes nos promotores de enzimas do metabolismo glicolítico, aumentando assim a capacidade glicolítica dos tumores e a habilidade de sobreviver em condições de baixa tensão de oxigênio. Os autores sugerem o uso da GAPDH como um marcador de proliferação celular em diversos tumores (Vila *et al.*, 2000).

Foi também proposto que GAPDH seja uma proteína de choque térmico (HSP36 ou HSP35), desde que a atividade enzimática específica e a síntese de GAPDH (HSP35) em embriões de *Xenopus laevis* é aumentada depois de choque térmico (Nickells *et al.*, 1991).

I.5.3 – GAPDH como adesina

Além do seu papel no metabolismo de carboidratos e outras funções celulares, a enzima GAPDH foi descrita como molécula de adesão em vários microrganismos patogênicos, sendo provavelmente associada à colonização e possível disseminação de patógenos. A GAPDH de *C. albicans* se liga às proteínas da matriz extracelular e, conseqüentemente, está associada ao estabelecimento da infecção (Gozalbo *et al.*, 1998). A GAPDH foi também detectada na superfície celular de *C. albicans* presente em tecidos infectados, o que suporta o papel dessa proteína no processo de infecção, através da ligação aos tecidos do hospedeiro (Gil *et al.*, 1999).

GAPDH também é descrita como a principal proteína de superfície de *Streptococcus pyogenes*, relacionada à virulência e patogênese. Assim, como já relatado para *C. albicans*, a GAPDH de *S. pyogenes* se liga a várias proteínas de mamíferos como, lisozima, fibronectina, actina, miosina e plasmina. A GAPDH também ativa tirosina quinases de células faringiais humanas; o tratamento dessas células com inibidores de quinases inibe significativamente o poder de invasão de *S. pyogenes* no hospedeiro humano (Pancholi & Fischetti, 1997).

Porphyromonas gingivalis e *Streptococcus oralis* são microrganismos que invadem células epiteliais de revestimento de mucosa, causando infecções e inflamações na cavidade oral. Foi descrito que a GAPDH desses microrganismos atua como ligante à MEC, o que contribuí para a colonização do hospedeiro (Maeda *et al.*, 2004; Hakimuddin *et al.*, 2005). Além disso, foi descrito que a GAPDH promove a adesão de *Mycobacterium avium* às células epiteliais (Reddy & Suleman, 2004). Em *Mycoplasma genitalium*, também foi relatado o papel da GAPDH como molécula da adesão (Alvarez *et al.*, 2003).

Em cepas enterohemorrágicas de *Escherichia coli*, GAPDH foi capaz de se ligar ao fibrinogênio e plasminogênio humanos, além de interagir com células do epitélio intestinal.

Foi verificado que, em adição à sua localização citoplasmática, a proteína também é secretada pelas cepas patogênicas, fato não observado em cepas não patogênicas. A secreção de proteínas é um dos principais mecanismos pelos quais os patógenos se comunicam com as células do hospedeiro (Egea *et al.*, 2007).

I.5.4 - GAPDH como antígeno

Além do seu papel como molécula de adesão, a enzima GAPDH foi descrita como antígeno em vários microrganismos patogênicos, exercendo, em alguns deles, função protetora contra infecção em modelos experimentais (Goudot-Crozel *et al.*, 1989). Dentre os microrganismos em que a GAPDH foi descrita como molécula antigênica podemos citar: *P. brasiliensis* (Fonseca *et al.*, 2001), *C. albicans* (Chaffin *et al.*, 1998), *Staphylococcus aureus* (Modum & Williams., 1999), *Staphylococcus epidermidis* (Pancholi *et al.*, 1997), *Schistosoma mansoni* (Gozalbo *et al.*, 1998), *Streptococcus pneumoniae* (Ling *et al.*, 2004).

Além do seu papel antigênico e função potencial no processo de infecção por microrganismos, a GAPDH foi relatada como imunogênica. Tallima *et al.* (2003), demonstraram o papel potencial da GAPDH e da triose fosfato isomerase de *S. mansoni* como moléculas a serem utilizadas na produção de vacinas contra esquistossomíase em humanos. A GAPDH recombinante de *Edwardsiella tarda*, enterobactéria isolada da água e causadora de patologias em reptéis, pássaros e mamíferos, incluindo humanos, mostrou-se eficaz como vacina na prevenção e combate a edwardsielose (Liu *et al.*, 2005). Em *S. pneumoniae*, GAPDH foi capaz de elicitar a resposta imune protetora em camudongos, quando os mesmos foram desafiados com cepas virulentas desse microorganismo (Ling *et al.*, 2004).

I.5.5 - GAPDH de *P. brasiliensis*

GAPDH de *P. brasiliensis* é uma molécula reativa com soros de pacientes portadores de PCM (Fonseca *et al.*, 2001). Em função desses resultados, seqüências codificantes para a GAPDH, foram clonadas e caracterizadas. O cDNA apresenta 1.717 pares de bases e a seqüência genômica é constituída por cinco exons, intercalados por quatro íntrons. A seqüência deduzida da proteína é constituída por 338 resíduos de aminoácidos. A expressão da GAPDH é regulada durante o desenvolvimento das fases em *P. brasiliensis*, sugerindo seu envolvimento na patogênese deste fungo (Barbosa *et al.*, 2004).

Bailão *et al.* (2006), utilizaram a Análise de Diferença Representacional de cDNA (cDNA-RDA) para identificar genes de *P. brasiliensis* induzidos durante o processo infectivo em fígado de animais experimentais, e em condições que mimetizavam a via hematogênica de disseminação fúngica. Durante a infecção, a GAPDH foi diferencialmente expressa; resultado similar foi observado quando células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram incubadas com sangue humano, corroborando o possível envolvimento dessa molécula na patogênese do fungo. GAPDH também foi identificada no transcriptoma de *P. brasiliensis* obtido de fígado de camundongos B10, o que reforça seu possível papel no processo infectivo (Costa *et al.*, em revisão).

No presente trabalho foi demonstrado que a GAPDH está associada à parede de *P. brasiliensis*, onde é capaz de se ligar a componentes da matriz extracelular, como laminina, fibronectina e colágeno tipo I. Além disso, foi demonstrado que a GAPDH é capaz de mediar à aderência e internalização de *P. brasiliensis* às células cultivadas *in vitro*, o que sugere o seu papel potencial no estabelecimento da doença.

Capítulo II

Artigos publicados

II - JUSTIFICATIVA

A PCM é a micose sistêmica de maior prevalência na América Latina, com o maior número de relatos de casos no Brasil. A micose acomete predominantemente indivíduos do sexo masculino entre 30 e 60 anos de idade, trabalhadores rurais, residentes em áreas endêmicas. A importância da PCM resulta não somente de sua prevalência relativamente alta, mas também da severidade de suas formas clínicas.

A capacidade de *P. brasiliensis* de provocar micose com grande variedade de manifestações clínicas, depende da complexidade de interações entre *P. brasiliensis* e o hospedeiro humano. Algumas proteínas são necessárias durante a interação com o hospedeiro, conferindo um fenótipo patogênico, por permitir ao fungo aderir aos tecidos do hospedeiro, invadir novos compartimentos, evadir da resposta imune, bem como outras interações hospedeiro-específicas. Embora os mecanismos de adesão e infecção de *P. brasiliensis* permaneçam pouco entendidos, foi sugerido que a capacidade de *P. brasiliensis* de aderir aos tecidos do hospedeiro seja um fator importante para o estabelecimento da infecção.

Em estudos prévios do laboratório, utilizando-se ferramentas de imunoprotômica foi demonstrado que a GAPDH é um antígeno de *P. brasiliensis* altamente expresso na fase leveduriforme. Devido ao interesse do nosso laboratório em estudar moléculas potencialmente associadas à interação do fungo com o hospedeiro, procedemos os estudos no intuito de avaliar o papel funcional dessa molécula na patogênese da PCM.

Capítulo III

*ARTIGOS PUBLICADOS EM COLABORAÇÃO NO PERÍODO
DE REALIZAÇÃO DO DOUTORADO*

III - OBJETIVOS

Proteínas de superfície celular são moléculas potencialmente associadas à interação do fungo com o hospedeiro humano. O estudo dessas moléculas envolvidas na interação patógeno-hospedeiro é um dos principais interesses de nosso grupo.

Visando esse enfoque, o presente estudo teve como objetivos específicos:

1. Obtenção e caracterização de seqüências codificantes para GAPDH de *P. brasiliensis*.
 - Estratégias:
 - ✓ Rastreamento de biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis*;
 - ✓ Amplificação via PCR, do DNA genômico de *P. brasiliensis*, utilizando-se um par de oligonucleotídeos correspondentes às extremidades 5' e 3' do cDNA.

2. Análise da expressão da GAPDH nas formas de *P. brasiliensis*.
 - Estratégias:
 - ✓ *Northern blot* utilizando RNA extraído de diferentes tempos da transição dimórfica;
 - ✓ *Western blot* realizado com extratos protéicos, obtidos durante a diferenciação celular.

3. Expressão heteróloga do cDNA codificante para GAPDH de *P. brasiliensis* e purificação da proteína recombinante.
 - Estratégias:

- ✓ Clonagem do cDNA em vetor de expressão (TOPO-pET100 (Invitrogen, Life Technologies);
 - ✓ Indução da expressão da proteína recombinante em sistema bacteriano;
 - ✓ Purificação da proteína recombinante através de cromatografia de afinidade.
4. Produção de anticorpos policlonais, anti-GAPDH
- Estratégia
 - ✓ Inoculação da proteína purificada em coelhos, com adjuvante completo de Freund, pela via sub-cutânea.
5. Localização da GAPDH em células leveduriformes de *P. brasiliensis*.
- Estratégia
 - ✓ Imunocitoquímica realizada com o anticorpo anti-GAPDH através de microscopia eletrônica de transmissão.
6. Avaliar a capacidade da proteína GAPDH de se ligar a componentes da matriz extracelular
- Estratégia
 - ✓ “Far-Western blotting” realizado com a proteína recombinante através de ligação desta à componentes da MEC (laminina, fibronectina, e colágeno tipo I e tipo IV).
7. Verificar o papel da proteína GAPDH e do anticorpo anti-GAPDH, nos processos de adesão e invasão de *P. brasiliensis* às células epiteliais
- Estratégia

Mônica Santiago Barbosa

- ✓ Infecção de *P. brasiliensis* à monocamada de células do epitélio pulmonar (linhagem A549), tratadas com a proteína GAPDH
- ✓ Infecção de *P. brasiliensis* à monocamada de células A549, após o contato do fungo com o anticorpo anti-GAPDH.

Capítulo IV

DISCUSSÃO

PERSPECTIVAS

IV. 1- DISCUSSÃO

Através de técnicas de imunoproteômica, **Fonseca et al., (2001)** identificaram, em nosso laboratório, determinantes antigênicos de *P. brasiliensis*, utilizando combinações de soros de pacientes com diferentes manifestações clínicas da PCM. Dentre os antígenos identificados no proteoma de *P. brasiliensis*, uma molécula de 36 kDa, *pI* 6,8 foi parcialmente caracterizada. A proteína isolada do gel de eletroforese bidimensional foi digerida com endoproteínase Lys-C e submetida à sequenciamento. Análise de peptídeos amino terminal e peptídeos internos evidenciaram alta homologia com GAPDH de diversos microorganismos (**Ignatov et al., 2000**).

GAPDH é uma enzima da via glicolítica e gliconeogênese, que catalisa a reação de oxidação da gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato, usando o NAD^+ como coenzima (**Baynes & Dominiczak., 2000**). Em *C. albicans*, as enzimas glicolíticas, como GAPDH, enolase, fosfoglicerato quinase, álcool desidrogenase, piruvato quinase e aldolase, são importantes durante a patogênese, atuando como indutores da resposta imune do hospedeiro durante a candidíase (**Chaffin et al., 1998**). As enzimas glicolíticas frutose 1,6-bifosfato aldolase (FBA) e GAPDH de *S. pneumoniae*, foram fortemente reconhecidas por soros de crianças infectadas e nenhuma reatividade foi observada com soros de indivíduos controle. O nível elevado de anticorpos anti-GAPDH e anti-FBA no soro de pacientes infectados, foi relacionado com a diminuição da morbidade em crianças que apresentavam quadro de pneumonia em decorrência da infecção causada por *S. pneumoniae* (**Ling et al., 2004**).

No presente trabalho, a sequência codificante para a GAPDH de *P. brasiliensis* (*Pbgapdh*) foi obtida através do rastreamento de biblioteca de cDNA, fase leveduriforme de *P. brasiliensis*. O cDNA apresentou 1.717 nucleotídeos, sendo as regiões 5' e 3' não traduzidas constituídas de 187 e 513 nucleotídeos, respectivamente. O ATG na posição 188,

codificando para a possível metionina iniciadora, está no contexto de um sítio consenso de iniciação, que consiste de uma adenina na posição -3 (**Kozak, 1986**) A sequência genômica foi também caracterizada, apresentando cinco exons intercalados por quatro íntrons. Os possíveis íntrons são constituídos por 70, 64, 92 e 72 nucleotídeos, respectivamente. De acordo com **Gurr et al.** (1987), os íntrons de fungos filamentosos são pequenos, em média menores de 100 pb. Vários clones genômicos de *P. brasiliensis* foram obtidos e confirmam a prevalência de íntrons pequenos (**Morais et al., 2000; Pereira et al., 2004; Daher et al., 2005**). Todos os íntrons da GAPDH de *P. brasiliensis* são flanqueadas por 5'GT e 3'AG, sendo que os dois primeiros apresentam sinais consensuais requeridos para o processo de junção intra molecular (splicing) (**Turner, 1993**).

O número e a posição dos íntrons da GAPDH estão filogeneticamente relacionados (**Harmsen et al., 1992**). Na sequência genômica da GAPDH, a posição do último intron é característica da maioria do eurotiomicetos, mas ausente nos sordariomicetos, ao passo que o intron que se inicia nos aminoácidos 42/43 é comum em todos os genes de GAPDH pertencentes aos fungos sordariomicetos, dotiomicetos e eurotiomicetos analisados [*Cryphonectria parasitica* (GenBank X53996), *Sordaria macrospora* (GenBank AJ313527), *Neurospora crassa* (GenBank U67457), *Claviceps purpurea* (GenBank X73282), *Podospora anserina* (GenBank X62824), *Phaeosphaeria nodorum* (GenBank AJ271155), *Curvalaria lunata* (GenBank X58718), *Cochiliobolus heterostrophus* (GenBank X63516), *Monascus anka* (GenBank AB047580), *Aspergillus oryzae* (GenBank AF320304), *Emericella nidulans* (GenBank M19694), *Aspergillus niger* (GenBank X99652), *P. brasiliensis* (GenBank Accession AY061958), *A.capsulatus* (GenBank Accession AF273703)]. Esses resultados estão de acordo com a posição filogenética obtida a partir da sequência de aminoácidos da GAPDH dos fungos (**Barbosa et al., 2004**). Nós sugerimos que a GAPDH de *P. brasiliensis*,

pode ser utilizada para análises filogenéticas, assim como descrito para outros fungos (**Neveu et al 2007**).

PbGAPDH codifica para uma proteína de 338 aminoácidos, semelhante à descrição de outras seqüências da GAPDH (**Fourrat et al., 2007**). A massa molecular predita é de 36.470 Da, valor compatível com resultados obtidos em nossos experimentos realizando eletroforese bidimensional. Na seqüência deduzida de aminoácidos da *Pbgapdh*, foi possível localizar, todos os peptídeos seqüenciados a partir da proteína nativa, confirmando que o clone isolado através do rastreamento do banco de cDNA, corresponde à proteína isolada através de eletroforese bidimensional e submetida à seqüenciamento de peptídeos amino terminal e internos (**Fonseca et al., 2001; Barbosa et al., 2004**).

Foram observadas regiões da molécula potencialmente relacionadas à atividade enzimática. O motivo ASCTTNCL, característico de ligação à gliceraldeído 3-fosfato em vários organismos, localiza-se na posição 150-157 e está dentro do provável domínio catalítico de *Pbgapdh* (**Goudot-Crozel et al., 1989**). Pode-se observar ainda os prováveis sítios de ligação ao NAD e os sítios de ligação ao fosfato inorgânico, ambos também presentes dentro do provável domínio catalítico de *Pbgapdh*. Essas observações sugerem que a GAPDH é potencialmente ativa em *P. brasiliensis*. Comparações da seqüência deduzida de aminoácidos da *Pbgapdh* mostraram homologia com GAPDH de outros microorganismos. O maior valor de identidade encontrado foi de 88% e similaridade de 93% , quando se comparou com a GAPDH de *H. capsulatum* (**Ignatov et al., 2000**).

Uma única espécie de mRNA, de 2,0 Kb codificante para GAPDH foi observada, corroborando os dados obtidos em diversos transcriptomas de *P. brasiliensis*, em que se observou apenas um tipo de transcrito codificante para a proteína (**Felipe et al., 2005; Bailão et al., 2006; Costa et al., em revisão**). Vale ressaltar a presença de uma única espécie de mRNA e, pelo menos, duas isoformas de GAPDH em *P. brasiliensis*, o que sugere o papel de

modificações pós-traducionais no estabelecimento das referidas isoformas. Em concordância com essa sugestão, ocorrem vários sítios possíveis de fosforilação na GAPDH de *P. brasiliensis*. A presença de múltiplas formas da GAPDH, atribuídas a modificações pós traducionais, foi descrita em outros microrganismos. Em cepas enterohemorrágicas de *E. coli*, foi identificada no extrato protéico intracelular, duas isoformas da GAPDH, codificadas somente pelo gene *gapA*, o que reforça o papel das modificações pós-traducionais, resultando em formas alternativas da enzima com diferentes pontos isoelétricos (**Pessione et al., 2005; Egea et al., 2007;**). Por outro lado, GAPDH de *S. cerevisiae* é codificada por três genes, TDH1, TDH2 e TDH3, sendo que nenhum deles é individualmente essencial para a viabilidade celular. A síntese da proteína GAPDH é regulada de maneira independente; Tdh1 é sintetizada quando as células entram na fase estacionária ou quando são submetidas a choque térmico, ao passo que *tdh2* é reprimida pelo choque térmico (**Boucherie et al., 1995**).

Através de experimentos de *Northern* e *Western blot*, pode-se detectar que a GAPDH de *P. brasiliensis* é expressa de forma ligada ao desenvolvimento do fungo, com expressão preferencial na fase leveduriforme. As análises dos diversos transcriptomas de *P. brasiliensis*, demonstraram que a GAPDH é diferencialmente expressa em várias situações, como descrito a seguir.

Bastos et al. (2007), ao avaliarem o perfil transcricional de *P. brasiliensis*, durante a diferenciação morfológica de micélio para levedura, verificaram que a GAPDH é induzida durante a transição de fase. **Bailão et al. (2006)**, estudaram a expressão de transcritos preferenciais em condições de interação *P. brasiliensis*-hospedeiro. Nessas condições, o transcrito codificante para GAPDH foi super regulado, principalmente em células fúngicas recuperadas de infecção em modelo experimental, sugerindo o possível papel da GAPDH na adaptação e sobrevivência de *P. brasiliensis* no hospedeiro durante a infecção. Recentemente, foram analisados genes preferencialmente expressos em leveduras de *P. brasiliensis*, tratadas

com plasma humano, simulando sítios de infecção com inflamação. Nessa condição, GAPDH não foi super regulada, sugerindo a influência das células sanguíneas no perfil transcricional de *P. brasiliensis* (Bailão *et al.*, 2007).

Toxinas bacterianas ou lipopolissarídeos (LPS), quando introduzidas em células de mamíferos, podem desencadear resposta inflamatória e causar diversos danos em tecidos e órgãos como fígado e pulmão. Os eventos moleculares que mediam essa resposta, ainda não estão bem esclarecidos. Nesse sentido foi feito uma análise comparativa do proteoma de fígado e pulmão de camundongos infectados com LPS e animais controle. GAPDH foi super regulada em camundongos infectados, sendo duas vezes mais expressa em fígado e quatro vezes mais expressa em pulmão. Consistente com a super regulação da proteína, o nível de mRNA foi aumentado no fígado e no pulmão de animais infectados, quando comparado com o grupo controle. Os autores sugerem que o aumento da expressão da GAPDH, induzida pela toxina, possa ser um mecanismo importante, pelo qual LPS desencadeia apoptose nesses tecidos (Xie *et al.*, 2006). De fato foi demonstrando que LPS induz a oxido nítrico sintase, enzima que atua na nitrosilação da GAPDH; nessa condição, GAPDH é endereçada para o núcleo ocasionando toxicidade e morte celulares (Hara *et al.*, 2005).

Análises comparativas do proteoma de *A. nidulans* crescido em condições de estresse osmótico demonstraram que GAPDH é diferencialmente expressa. Foi observado um aumento da expressão da GAPDH, quando o fungo foi crescido na presença de cloreto de potássio. Os autores sugerem o potencial papel da GAPDH durante processo de osmo Adaptação do fungo (Kim *et al.*, 2007).

Para uma maior compreensão do papel funcional da GAPDH na relação parasita hospedeiro, precedemos à expressão da proteína em sistema heterólogo bacteriano. A proteína purificada obtida de bactérias transformadas com o plasmídeo TOPO-pET-100-GAPDH, exibiu uma massa molecular de 36 kDa, condizente com o tamanho da GAPDH deduzida e

nativa de *P. brasiliensis* (Fonseca *et al.*, 2001). A proteína recombinante foi utilizada para gerar anticorpo policlonal em coelhos, utilizado nos experimentos subseqüentes.

Com o intuito de se definir a localização da GAPDH em *P. brasiliensis*, realizamos experimento de *Western blot*, utilizando extrato de proteínas presentes na porção mais superficial da parede do fungo (Andreotti, *et al* 2005). Os resultados evidenciaram a presença da GAPDH na parede de *P. brasiliensis*; esse dado foi confirmado em experimentos de microscopia eletrônica de transmissão.

A proteína GAPDH, foi identificada na superfície celular de outros organismos. Em *C. albicans*, GAPDH está associada à parede celular, onde é enzimaticamente ativa. A GAPDH foi também detectada na superfície celular de *C. albicans* em tecidos infectados, sugerindo o papel desta molécula na patogênese durante candidíase (Gil *et al.*, 1999). Experimentos de *immunoblotting* e microscopia eletrônica demonstraram a presença da GAPDH na superfície celular de *S. cerevisiae*. Embora GAPDH seja ativa na parede celular de *S. cerevisiae*, o seu papel fisiológico ainda não foi estabelecido (Delgado *et al.*, 2003). Em *S. mansoni*, foi evidenciada a atividade da GAPDH na superfície do patógeno. A resistência humana à esquistossomíase foi relacionada à resposta imune contra GAPDH (Argiro *et al.*, 2000). Em bactérias como *E. coli* patogênicas e *Streptococcus*, a GAPDH é enzimaticamente presente na superfície celular, sendo provavelmente envolvida na interação com células do hospedeiro (Egea *et al.*, 2007; Johri *et al.*, 2007). O fato de a GAPDH extracelular ser enzimaticamente ativa na parede celular desses microrganismos indica que a estrutura da proteína foi mantida durante o processo de exportação, conservando assim a possibilidade da molécula desempenhar diferentes funções extracelulares. A presença de proteínas metabólicas citoplasmáticas, como enolase, frutose 1,6-bifosfato aldolase e triose fosfato isomerase é freqüentemente relatada na superfície de microrganismos (Pereira *et al.*, *in press*; López-Villar., 2006). O fato intrigante é como essas proteínas são endereçadas à parede, uma vez

que as mesmas não apresentam peptídeo sinal clássico. Foi observado que diversos fatores podem induzir a expressão da GAPDH na parede celular, como descrito a seguir.

A GAPDH de *C. albicans* foi expressa de forma heteróloga em *S. cerevisiae*, sendo observado que a porção N-terminal da proteína é capaz de direcionar a incorporação da molécula à parede de *S. cerevisiae* (Delgado *et al.*, 2003). O gene da GAPDH de *Kluyveromyces marxianus*, superexpresso em *S. cerevisiae*, promoveu acúmulo da proteína na parede celular da levedura, sendo uma evidência adicional da habilidade de *S. cerevisiae* em direcionar a GAPDH para a parede celular, sem a presença de um peptídeo sinal (Moreira *et al.*, 2000). A localização da GAPDH na parede de *S. cerevisiae* é induzida em condições de estresse, como limitação de nutrientes e aumento de temperatura. Fato interessante é que a incorporação da GAPDH na parede celular, em resposta ao estresse, não requer síntese de novo da proteína, indicando que ocorre um deslocamento da enzima citosólica preexistente (Delgado *et al.*, 2003).

Em *Lactobacillus crispatus*, a localização da GAPDH e da enolase na parede celular é dependente do pH. Foi demonstrado que em pHs baixos a GAPDH e enolase são mais expressas na superfície da bactéria. Foi sugerido que em pH ácido essas moléculas adquirem uma carga líquida positiva, ligando-se às moléculas com carga negativa presentes na parede celular, como o ácido lipoteicóico (Antikainen *et al.*, 2007). Experimentos mostraram que a expressão da GAPDH e enolase na parede da bactéria é reduzida em pH básico. Fato interessante é que o nível desses transcritos foi constante em diferentes pHs, sugerindo que o aumento da expressão da GAPDH e enolase na parede de *L. crispatus*, seja devido a uma redistribuição da localização da proteína, em decorrência do pH ácido e não devido à síntese de novos transcritos (Antikainen *et al.*, 2007). A presença da GAPDH na parede de *Streptococcus oralis* e *S. gordonii* também é dependente do pH (Nelson *et al.*, 2001; Wilkins, *et al.*, 2003), por outro lado não foi detectada nenhuma relação do pH, com a localização da

proteína de *S. pyogenes* e *E. coli*, sugerindo um mecanismo diferente de ancoramento da proteína na superfície desses microrganismos (Nelson *et al.*, 2001; Egea *et al.*, 2007).

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* (Mendes-Giannini *et al.*, 2000). Visto que a adesão do patógeno às células do hospedeiro é um pré-requisito para o estabelecimento da infecção, nesse trabalho nós avaliamos a habilidade da proteína GAPDH em se ligar às proteínas associadas à matriz extracelular. A GAPDH de *P. brasiliensis* foi capaz de ligar a laminina, fibronectina e colágeno.

Em *C. albicans*, GAPDH se liga a fibronectina e laminina, e possivelmente participa do processo da adesão a tecidos do hospedeiro; a molécula é considerada um fator de virulência na candidíase (Gozalbo *et al.*, 1998). Em cepas enterohemorrágicas e enteropatogênicas de *E. coli*, a GAPDH se liga a fibrinogênio e plasminogênio, o que possivelmente favorece a migração desses patógenos na mucosa do hospedeiro (Egea *et al.*, 2007). Em *Streptococcus* sp, a GAPDH é capaz de se ligar a várias proteínas de mamífero, como lisozima, actina, miosina, fibronectina e plasminogênio, podendo influenciar no processo de colonização e infecção do hospedeiro (Pancholi *et al.*, 2003; Jin., *et al* 2005). Foi identificado no secretoma e na superfície de *S. mansoni* e *Echinostoma caproni*, duas moléculas da via glicolítica, enolase e GAPDH, capazes de se ligar ao plasminogênio, provavelmente facilitando a invasão e a migração do parasita no tecido do hospedeiro (Jolodar *et al.*, 2003; Guillou *et al.*, 2007).

Outras moléculas de *P. brasiliensis* foram descritas com capacidade de se ligarem a proteínas da matriz extracelular. Foi evidenciada a interação da glicoproteína de 43 kDa com laminina e fibronectina (Mendes-Giannini *et al.*, 2006). Uma outra proteína de 30 kDa, *pI* 4.9 interage com laminina mas não com outros componentes da matriz extracelular (Andreotti *et al.*, 2005). Foram identificadas duas proteínas de 19 e 32 kDa presentes na

superfície celular de *P. brasiliensis*, que participariam do processo de adesão, interagindo com laminina, fibronectina e fibrinogênio (González *et al.*, 2005). Recentemente foi demonstrado pelo nosso grupo que a proteína triose fosfato isomerase e Dfg5p de *P. brasiliensis* também são capazes de ligar à laminina e fibronectina (Pereira *et al.*, *in press*; Castro *et al.*, 2007 em revisão).

A característica de adesina da GAPDH de *P. brasiliensis*, foi avaliada também pela interação da proteína recombinante como pneumócitos. Foi verificado que a proteína se liga às células de pneumócitos, reforçando seu papel como molécula de adesão. Em *E. coli* patogênica GAPDH interage com células do epitélio intestinal durante a infecção *in vitro* (Egea *et al.*, 2007).

Ensaio com células de *P. brasiliensis* pré-incubadas com anticorpo policlonal anti-GAPDH ou com a GAPDH recombinante inibiram a aderência e internalização do fungo em pneumócitos; sugerindo o seu potencial papel na adesão e invasão requeridas durante o processo infeccioso de *P. brasiliensis*. Nesse sentido a molécula pode ser definida como fator de virulência do fungo.

Foi proposto que a proteína GAPDH, localizada na parede de *Mycoplasma genitalium*, participa do processo inicial da infecção, uma vez que a interação da bactéria com proteínas do epitélio vaginal foi bloqueada, pela presença do anticorpo anti-GAPDH. A habilidade de *M. genitalium* em aderir à mucina, proteína do epitélio vaginal, está relacionada com a virulência do microrganismo (Alvarez *et al.*, 2003). *Mycoplasma suis* é uma bactéria que infecta eritrócitos causando anemia hemolítica no hospedeiro. O papel da GAPDH como adesina, foi avaliado nesse microrganismo. Cepas de *E. coli* não aderentes a eritrócitos, adquiriram a capacidade de adesão, quando transformadas com GAPDH de *M. suis*; a adesão aos eritrócitos foi inibida pelo anticorpo anti-GAPDH. Desta maneira foi sugerido que a proteína GAPDH, presente na parede de *M. suis*, desempenha um papel importante durante o

parasitismo (Hoelzle *et al.*, 2007). *Streptococcus suis* é um patógeno que causa meningite, septicemia e endocardite. Foi demonstrado que GAPDH de *S. suis* se liga a albumina e que mutantes defectivos na expressão da GAPDH, são menos aderentes a células do epitélio traqueal. Em outros ensaios de adesão, foi demonstrado que GAPDH inibe a aderência de *S. suis* à anéis de traquéia suína, indicando que GAPDH é um fator de virulência, importante na adesão da bactéria ao hospedeiro (Brassard., *et al* 2004).

P. giingivalis é um importante patógeno causador de periodontites. A interação de *P. giingivalis* com bactérias da microbiota oral, como *S. oralis*, é essencial para a colonização da cavidade oral. Foi proposto que a interação entre *P. giingivalis* e *S. oralis* é mediada pela GAPDH, uma vez que a proteína recombinante inibe o processo de agregação. Os autores sugerem que GAPDH atua como co-adesina, facilitando a agregação desses patógenos, o que favorece a formação da placa bacteriana (Maeda *et al.*, 2004).

Em *P. brasiliensis*, outras moléculas possivelmente atuam no processo de adesão do fungo com o hospedeiro. A adesão de *P. brasiliensis* a células epiteliais foi inibida pelo tratamento com as moléculas de 30 kDa e 43 kDa (Andreotti *et al.*, 2005). Além disso, foi demonstrado que o anticorpo anti-gp43, inibe o processo de adesão de leveduras a diferentes linhagens de células (Gesztési *et al.*, 1996). Recentemente foi descrito pelo nosso grupo, que tanto a proteína TPI, quanto o anticorpo anti-TPI são capaz de inibir a adesão do fungo por pneumócitos (Pereira *et al.*, *in press*).

Nesse trabalho nós caracterizamos uma nova adesina de *P. brasiliensis*. Os dados sugerem que a GAPDH está potencialmente envolvida nos mecanismos de adesão e colonização, requeridos durante o processo infectivo de *P. brasiliensis*. Esses dados podem levar a uma melhor compreensão da interação de *P. brasiliensis* com tecidos do hospedeiro e da patogênese da PCM.

IV. 2- PERSPECTIVAS

A realização desse trabalho permitiu a visualização das seguintes perspectivas:

- 1- Mapear os epítomos da molécula GAPDH, que efetivamente interagem com as proteínas da MEC;
- 2- Avaliar o potencial papel protetor da GAPDH contra infecção por *P. brasiliensis*, através de modelos animais;
- 3- Estudar as prováveis interações da GAPDH, com outras proteínas de *P. brasiliensis*, utilizando-se a metodologia do duplo-híbrido (em desenvolvimento);
- 4- Resolver a estrutura da GAPDH, através de cristalografia (em andamento)
- 5- Avaliar o papel funcional da GAPDH em *P. brasiliensis*, utilizando a metodologia de RNA interferente.
- 6- Caracterizar enzimaticamente a GAPDH;
- 7- Avaliar as possíveis vias de secreção da GAPDH em *P. brasiliensis*.

Capítulo V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS
