

FRANCISCO LAURINDO DA SILVA

TESE DE DOUTORADO

ESTABELECIMENTO DE MEDIADORES MOLECULARES
ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE INFECÇÃO DE *Paracoccidioides*
brasiliensis EM CÉLULAS DE MAMÍFERO “*in vitro*”

UFMG

2004

UFMG

FRANCISCO LAURINDO DA SILVA

17/0052

2004

Francisco Laurindo da Silva

ESTABELECIMENTO DE MEDIADORES MOLECULARES
ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE INFECÇÃO DE *Paracoccidioides*
brasiliensis EM CÉLULAS DE MAMÍFERO “*in vitro*”

Belo Horizonte
Instituto de Ciências biológicas
2004

Francisco Laurindo da Silva

ESTABELECIMENTO DE MEDIADORES MOLECULARES
ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE INFECÇÃO DE *Paracoccidioides*
brasiliensis EM CÉLULAS DE MAMÍFERO “*in vitro*”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ary Corrêa Junior

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
2004

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho de modo
especial à minha esposa e aos
meus filhos, pelo apoio e
compreensão

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter permitido a concretização de mais um sonho.

Aos meus pais pelo apoio, especialmente em momentos difíceis.

Aos Profs. Drs. Ary Corrêa Júnior e Arthur da Silveira Pinto, pela orientação e transmissão de conhecimentos ao longo desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Macêdo de Farias, pela colaboração nos momentos difíceis.

À Prof^a Dra. Deborah aparecida Negrão Corrêa pela colaboração, transmissão de conhecimentos e amizade.

Ao Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira por ter disponibilizado as instalações do seu laboratório durante a execução desse trabalho.

Aos amigos Flávio Furtado e Francisca Lúcia pela colaboração, sobretudo nos momentos iniciais dessa jornada.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia (UFPI), pelo apoio e incentivo, em especial o colega Fernando Lineu.

Ao amigo Dilson pela colaboração e amizade.

À Colega Tânia (UFMG) pela colaboração na execução de alguns experimentos.

A todos os colegas do Laboratório de Mecanismos Gerais de Infecções Fúngicas, pela amizade e companheirismo.

Às instituições financiadoras CAPES, CNPq, PADCT e PRPq/UFMG, Ministério da Saúde pelo suporte financeiro e PICDT.

SUMMARY

Very little is known about the early events in the interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* cells and its host. In order to unveil the role of carbohydrates, peptides and self-produced molecules on the mechanisms of interaction between the fungus and epithelial cell in culture, we analyzed the effect of Sorbitol, D-mannose, D-fucose, N-acetyl-glucosamine, D-glucosamine, Fructose and D-galactosamine, the peptides GRDSPK, GRGDTP e GRDGS and culture supernatant on the adhesion of *P. brasiliensis* yeast cells to CCL-6 cells on culture. The fungal cells were cocultivated with the epithelial cell line and different concentrations of the interaction. Six hours after the treatment the cells were fixed and observed on light microscopy. The number of *P. brasiliensis* cells adhered to the CCL-6 monolayer was estimated. D-fucose, N-acetyl-glucosamine, D-mannose, D-glucosamine and D-galactosamine treatments diminished the number of adhesion events if compared to the observed with untreated controls. Sorbitol and Fructose treated cells had the same adhesion behavior as the observed in the controls. In order to detect the presence of carbohydrates in the fungus surface, *P. brasiliensis* propagules were treated with fluorescent lectins. WGA-FITC and Con-A-FITC lectins labeled *P. brasiliensis* cells while SBA and PNA lectins did not bind to the yeast cell. The peptides GRDSPK, GRGDTP also diminished the number of adhesion events observed and antibodies against $\alpha_1\beta_1$ and β_2 integrins labeled *P. brasiliensis* cells. Old RPMI culture supernatant of *P. brasiliensis* also diminished the adhesion events of the fungus on CCL-6 cells. The molecule responsible for such effect is unknown, but is thermostable and non-proteic.

RESUMO

Apesar dos inúmeros estudos empreendidos nas últimas décadas na tentativa de elucidar os mecanismos de interação entre *Paracoccidioides brasiliensis* versus hospedeiros, durante o curso da paracoccidioidomicose (PCM), poucas são as informações disponíveis na literatura que mostram de maneira precisa como ocorre o processo infectivo. Para auxiliar na melhor compreensão dos possíveis mecanismos moleculares envolvidos na interação de *P. brasiliensis* com seus hospedeiros, estabeleceu-se um modelo de estudo *in vitro*, que pudesse evidenciar a participação de mediadores de adesão de superfície celular na interação do fungo (Pb₁₈) com células epiteliais CCL-6 em cultura. Os carboidratos, D-manose, D-fucose, N-acetil-D-glicosamina, sorbitol, D-galactosamina e D-glicosamina, os peptídeos GRGDTP, GRDGS e GRGDSPK, e sobrenadante de cultura líquida de *P. brasiliensis*, foram utilizados como competidores de inibição de adesão do *P. brasiliensis* em células CCL-6. Também foram utilizadas, em ensaios citoquímicos, as lectinas ConA, WGA, PNA e SBA conjugadas com o fluorocromo FITC, bem como anticorpos específicos para a subunidade β_2 e para as integrinas $\alpha_{11}\beta_1$ e CD₁₈. Observou-se que nos tratamentos realizados com os carboidratos D-manose, D-fucose e N-acetil-glicosamina, o peptídeo GRGDSPK e o sobrenadante de cultura líquida do *P. brasiliensis* os percentuais de inibição de adesão do fungo a célula CCL-6 foram bastante significativos. Células leveduriformes do *P. brasiliensis* foram prontamente marcadas nos tratamentos realizados com as lectinas ConA e WGA e com anticorpos anti-integrina $\alpha_{11}\beta_1$ e β_2 . Ensaios cromatográficos, de espectro de ressonância magnética nuclear e de espectro de infravermelho da fração livre de proteínas do sobrenadante da cultura de *P. brasiliensis*, demonstraram a presença de uma substância composta de hidrogênio, carbono e de um grupamento amina, que possivelmente seja a molécula que compete pelo sítio de ligação do fungo a células CCL-6.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Fotomicrografias de células de *P. brasiliensis* aderidas e internalizadas em células CCL-6 após 6 h de infecção. 42
- Figura 2:** Perfil de adesão de *P. brasiliensis* à monocamada de células CCL-6, após uso dos monossacarídeos Sorbitol, D-manose, D-fucose e N-acetil glucosamina 43
- Figura 3:** Perfil de adesão de células de *P. brasiliensis* à monocamada de células CCL-6 após uso dos monossacarídeos D-glicosamina e D-galactosamina 44
- Figura 4:** Células leveduriformes de *P. brasiliensis* com pré-tratamento com anticorpos primários ant- $\alpha_{11}\beta_1$ (a) e β_2 (b), e pós-tratamento com anticorpo secundário conjugado com FITC. 45
- Figura 5:** Células de *P. brasiliensis* marcadas com as lectinas WGA, ConA conjugada com FITC. 46
- Figura 6:** Adesão de *P. brasiliensis* à monocamada de células CCL-6 após tratamento com GRGDSPK GRGDTP e RDGS. 47
- Figura 7:** Número de eventos de adesão de *P. brasiliensis* à monocamada de células CCL-6 após tratamento com anticorpos anti-gp₄₃ (1/10) e ant-Pbtotal (1/100). 48
- Figura 8:** Perfil de adesão de propágulos de *P. brasiliensis* à monocamada de células CCL-6 após tratamento com sobrenadantes de cultura fúngica com 4, 6, 8, 10 e 12 dias e inoculação com células de *P. brasiliensis* cultivadas pelo mesmo período. 50
- Figura 9:** Número de eventos de adesão de *P. brasiliensis* à monocamada de células CCL-6, após tratamentos realizados com sobrenadante de cultura do fungo com 4, 6 e 8 dias. 51
- Figura 10:** Número de eventos de adesão de *P. brasiliensis* à monocamada de células CCL-6 após tratamento com sobrenadantes com 7 dias, com e sem a adição de soro fetal bovino ou após o tratamento térmico por autoclavagem. 52
- Figura 11:** Número de eventos de adesão de propágulos de *P. brasiliensis* à monocamada de células CCL-6. A) Controle não tratado; B) pré-tratada com o sobrenadante de 7 dias não fracionado; C) Fração protéica do sobrenadante e D) Fração não proteica. 53

Figura 12:	Número de eventos de adesão de <i>P. brasiliensis</i> à monocamada de células CCL-6 após tratamento com os eluatos de uma coluna de Sepharose-ConA (F1-F4), o fator modulador não purificado (FMT) e o sobrenadante total de cultura (ST).	54
Figura 13:	Perfil cromatográfico da fração livre de proteínas do sobrenadante de <i>P. brasiliensis</i> em placa de sílica gel.	55
Figura 14:	Espectro da ressonância magnética nuclear de hidrogênio da molécula secretada pelo <i>P. brasiliensis</i> .	56
Figura 15:	Espectro da ressonância magnética nuclear de carbono da molécula secretada pelo <i>P. brasiliensis</i> .	57
Figura 16:	Espectro de infravermelho da molécula secretada pelo <i>P. brasiliensis</i> .	58

LISTA DE SIGLAS

PCM	Paracoccidiodomicose
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
GRGDTP	Glicina, arginina, glicina, ácido aspártico, tirosina e fenilalanina
GRDGS	Glicina, arginina, ácido aspártico, glicina e serina
GRGDSPK	Glicina, arginina, glicina, ácido aspártico, serina, fenilalanina e lisina
ConA	Concanavalina A
WGA	Aglutinina de germe de trigo
PNA	Aglutinina do amendoim
SBA	Aglutinina de soja
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
WT e 6.5E	Anticorpos anti-CD18 de linfócitos
A ₁₁ β ₁ e β ₂	Anticorpos anti-integrina
Gp ₄₃	Glicoproteína de 43kDa
ICB/UFMG	Instituto de Ciência Biológica/Universidade Federal de Minas Gerais
PMNs	Células polimorfonucleares
RAPD	Amplificações randômicas de seqüência polimórficas de DNA
KOH	Hidróxido de potássio
LLM-CK ₂	Células epiteliais do rin de macaco, número de ATCC-CCL-7.1
CCL-6	Células do epitélio do intestino humano (Henle-407)
RGD	Arginina, Glicina e Ácido aspártico
MEC	Matriz extracelular
RPMI	Designação referente ao laboratório de fabricação (Roswell Park Memorial Institute)
HEPES	Substância tamponante do meio de cultura RPMI
FDA	Diacetato de fluoresceína
BE	<i>Brometo de etidium</i>
PBS	Tampão fostato de sódio
N ₂	Nitrogênio líquido

EDTA	Sal dissódico ácido etilenodiaminotetraacético
BSA	Albumina de soro bovino
C/soro	Sobrenadante de cultura de <i>P. brasiliensis</i> com soro fetal bovino
S/soro	Sobrenadante de cultura de <i>P. brasiliensis</i> sem soro fetal bovino
SA	Sobrenadante autoclavado
F1 a F4	Frações obtidas após passagem da fração livre de proteínas do sobrenadante de cultura líquida do <i>P. brasiliensis</i> em coluna de ConA
FMT	Fração do sobrenadante de cultura do fungo livre de proteínas
ST	Sobrenadante total sem fracionamento

SUMÁRIO	
AGRADECIMENTOS	iii
SUMMARY	iv
RESUMO	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE SIGLAS	viii
SUMÁRIO	x
INTRODUÇÃO	11
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
Paracoccidiodomicose	13
Agente etiológico	15
Aspectos morfológicos e de parede do <i>P. brasiliensis</i> .	16
Fatores de virulência	16
Influência Hormonal	18
Diagnóstico	18
Tratamento	19
Interação <i>Paracoccidoídes brasiliensis</i> / Hospedeiro	20
Mediadores de adesão celular	22
Integrinas	23
Carboidratos	26
Lectinas	27
OBJETIVOS	29
Objetivo Geral	30
Objetivos Específicos	30
MATERIAIS E MÉTODOS	31
Isolados de <i>Paracoccidoides brasiliensis</i> e células Henle 407 (ATCC-CCL-6)	32
Manutenção do isolado de <i>P. brasiliensis</i>	32
Manutenção da linhagem celular hospedeira	33
Obtenção de sobrenadante total e fracionado de cultura de <i>P. brasiliensis</i>	33
Dosagem de proteínas	34
Produção de ascite contendo anticorpos monoclonais anti-gp-43	34

Interação entre de <i>P. brasiliensis</i> com células CCL-6	35
Imunolocalização	35
Modulação de adesão mediante o uso de carboidratos	36
Marcação de Células de <i>P. brasiliensis</i> com lectinas fluorescentes	37
Marcação de <i>P. brasiliensis</i> com anticorpos anti-integrinas	37
Ensaio de inibição de adesão de <i>P. brasiliensis</i> em células CCL-6	38
Fixação das interações celulares entre células hospedeiras e <i>P. brasiliensis</i>	38
Análises microscópicas das interações celulares	39
Cromatografia de afinidade	39
Cromatoplaça	39
Ressonância magnética nuclear da molécula secretada pelo <i>P. brasiliensis</i> em cultura	40
Espectrometria no infravermelho da molécula secretada pelo <i>P. brasiliensis</i> em cultura	40
Análise estatística.	40
RESULTADOS	41
Interação de <i>P. brasiliensis</i> em células CCL-6	42
Inibição de adesão de <i>P. brasiliensis</i> em células CCL-6 pelo uso de carboidratos	43
Marcação de propágulos de <i>P. brasiliensis</i> com lectinas fluorescentes	44
Inibição de adesão de <i>P. brasiliensis</i> a célula CCL-6 pelo uso de peptídeos	45
Imunolocalização de receptores semelhantes a integrinas em células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i>	47
Inibição de aderência de <i>P. brasiliensis</i> em células CCL-6 mediada por anticorpos anti-gp ₄₃ e anti-Pb-total	48
Molécula secretada por <i>P. brasiliensis</i> modula sua adesão em células CCL-6	49
Efeito das frações de sobrenadante de cultura de <i>P. brasiliensis</i> na medição de adesão	52
DISCUSSÃO	59
CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

INTRODUÇÃO

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo termodimórfico encontrado sob as formas miceliana em seu estágio saprofítico e leveduriforme quando parasita, sendo o *P. brasiliensis*, considerado um patógeno biotrófico para humanos. Trata-se do agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma doença que acomete preferencialmente trabalhadores rurais. A doença distribui-se de modo irregular nas Américas, sendo mais prevalente na América do Sul especialmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste do Brasil.

Acredita-se que a PCM é iniciada após a inalação de propágulos do fungo que chegando no interstício pulmonar do hospedeiro diferencia-se na forma leveduriforme patogênica. Devido à gravidade de suas formas clínicas, o estudo da PCM vem despertando interesse, notadamente de pesquisadores brasileiros e onde a doença é endêmica. As manifestações clínicas são típicas de uma doença granulomatosa, com freqüente envolvimento de vários órgãos. O completo processo desenvolvido na interação entre *P. brasiliensis* e seu hospedeiro, na grande maioria não está totalmente estabelecido. Tem-se postulado que uma glicoproteína (gp₄₃), presente na parede celular do fungo, seja a molécula responsável pela interação do fungo com o hospedeiro. Este trabalho faz parte de uma das linhas de pesquisa desenvolvidas no Laboratório de Mecanismos Gerais de Infecções Fúngicas (ICB/UFMG) e visa determinar “*in vitro*” os mediadores moleculares envolvidos no processo de infecção de *P. brasiliensis* em células de mamíferos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

PARACOCCIDIOIDOMICOSE (PCM)

A paracoccidiodomicose é uma micose sistêmica causada por um fungo dimórfico denominado *Paracoccidioides brasiliensis* por Splendore 1912. A doença apresenta-se com distribuição irregular dentro do continente Americano, sendo mais prevalente na América do Sul (Restrepo, 1985). Estima-se que aproximadamente 10 milhões de pessoas estão infectadas com o fungo e cerca de 2% dessa população pode vir a desenvolver a doença. A maior incidência da enfermidade ocorre em indivíduos com idade entre 30 e 60 anos sendo mais freqüente em trabalhadores rurais (Borelli 1980).

No Brasil, o *P. brasiliensis* foi inicialmente isolado por Adolpho Lutz em 1908, em pacientes com lesões na mucosa da boca (Lacaz, Martins e Porto, 1991). A infecção por *P. brasiliensis* pode apresentar um quadro clínico grave e nos últimos anos a doença vem recrudescendo, com um número elevado de casos. A expressiva importância epidemiológica e sua distribuição confinada à América Latina faz desta micose um modelo de estudo de interesse, notadamente para pesquisadores brasileiros e outros sul-americanos (Lacaz *et al.*, 1991).

As manifestações clínicas da PCM são típicas de uma doença granulomatosa crônica, com o envolvimento freqüente dos pulmões, sistema retículo endotelial, mucosas e outros órgãos (Giraldo, *et al.*, 1976; Franco *et al.*, 1982). Trata-se observado que a infecção inicia-se dentro dos pulmões, com eventual disseminação via corrente sanguínea ou linfática para outros sítios do corpo (San-Blas *et al.*, 1982). A progressão da infecção à doença depende de fatores como: tamanho do inóculo, virulência do isolado, integridade dos mecanismos de defesa e de fatores genéticos do hospedeiro (Colombo, Nucci e Queiroz-Teles., 1980). Muitos pacientes infectados por *P. brasiliensis*, entretanto, desenvolvem a doença de forma assintomática ou sub-clínica, com localização restrita aos pulmões ou e tecidos mucocutâneos.

O desenvolvimento da PCM está inicialmente condicionado à diferenciação do fungo, da forma miceliana infectante para a forma leveduriforme invasiva, que pode evoluir produzindo lesões de inoculação nos pulmões, ou ser destruída pelo mecanismo de defesa do hospedeiro. A partir dessas lesões, o fungo entra na corrente linfática chegando aos linfonodos regionais, onde produz uma lesão linfática

satélite, dando origem a um complexo primário. Este complexo por sua vez poderá regredir com a destruição do fungo, formando cicatrizes estéreis, ou ainda manter-se viável na forma latente, assim caracterizando um foco quiescente (Franco *et al.*, 1982).

A PCM apresenta sintomatologia variada, resultando em quadros clínicos diversos, que servem de parâmetros para a classificação da doença, dividindo-a em disseminada (aguda) ou localizada (crônica), e dependendo da localização e evolução, em uni ou multifocal (Franco *et al.*, 1987). A forma aguda é caracterizada por pacientes apresentando um quadro em que a doença tem evolução direta e rápida. Neste estágio a doença é sistêmica afetando principalmente o sistema retículo endotelial com os pacientes desenvolvendo uma forte resposta humoral, porém uma deficiente resposta imune celular. A forma crônica por vezes, acomete frequentemente os pulmões, outros órgãos e áreas mucocutâneas. Pacientes com essa forma apresentam uma resposta imune celular bastante forte, resultando na forma de granuloma (Montenegro, 1986).

Com base no quadro clínico dos pacientes, essa micose também pode ser classificada em anérgica (maligna), caracterizada por doença disseminada, enfraquecimento da resposta imune celular, altos níveis de Anticorpos específicos, baixa formação de granuloma, aparecimento de áreas necrosadas e um grande número de leveduras dentro das lesões, enquanto que a forma hiperérgica da PCM (benigna) a doença é localizada, com forte resposta imune celular, baixos níveis de anticorpos específicos, formação de compactos granulomas epitelióides e poucos fungos nas lesões (Zameth, *et al.*, 1981; Lacaz *et al.*, 1982).

Fagócitos mononucleares, leucócitos e células NK (*natural killer*), são fundamentais na resistência natural ao *P. brasiliensis* (Peryassú, 1962). Células polimorfonucleares (PMNs) e macrófagos residentes de focos infecciosos e circulantes do sangue de pacientes com PCM apresentam níveis normais de fagocitose, entretanto, não são capazes de destruir o fungo, assim servindo como suporte para a multiplicação intracelular do patógeno (Restrepo *et al.*, 1975; Gohman-Yahr *et al.*, 1980; Pascuim *et al.* 1982; Jimenez, *et al.*, 1984; Boscardin *et al.*, 1985; Brummer *et al.*, 1989).

Devido à capacidade de sintetizar e expressar várias substâncias antigênicas, o *P. brasiliensis*, em algumas circunstâncias, pode induzir hipersensibilidade. Algumas dessas substâncias são secretadas no meio de cultura bem como podem estar presentes na superfície celular de ambas as formas: miceliana ou

leveduriforme. A presença dessas partículas antigênicas no interior do hospedeiro, podem induzir a produção de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis* (Arango *et al.*, 1982; Biagioni *et al.*, 1984; Restrepo, 1982).

AGENTE ETIOLÓGICO

Taxonomicamente o *P. brasiliensis* está classificado na seguinte categoria: Reino-Fungi; Filo-Ascomycota; Subdivisão-Pezizomycotina; Classe-Eurotiomycetes; Ordem-Onygenales; Família-Onygenaceae; Gênero-*Paracoccidioides*; Espécie *Paracoccidioides brasiliensis* (Peterson *et al.*, 1998). O fungo, agente etiológico da PCM, é organismo dimórfico que cresce sob a forma miceliana à temperatura ambiente e leveduriforme a 37 °C. A forma parasita é a leveduriforme, enquanto o nicho ecológico natural da fase saprofítica continua desconhecido. Micélio, clamidósporos e provavelmente conídias podem manter-se viáveis no solo, na água e em plantas à temperatura ambiente, e são reconhecidos como as formas infectantes do patógeno (Restrepo, 1985).

Propágulos do fungo foram isolados a partir de amostras de solo, da ração de um cão, das fezes de pingüim, do trato gastrointestinal de morcegos, das vísceras de tatu e da maioria de pacientes com PCM (Bagagli *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 1990; Garcia *et al.*, 1993). Embora *P. brasiliensis* seja reconhecido unicamente como sendo um parasita humano o isolamento do fungo a partir de tatus (*Dasypus novemcinctus*), sugere que este animal pode servir como hospedeiro silvestre do patógeno (Restrepo 1990).

Dados epidemiológicos são de grande interesse na localização de áreas endêmicas e hiper-endêmicas da PCM, sendo o diagnóstico epidemiológico feito principalmente pelo teste da paracoccidioidina (Lacaz *et al.*, 1994). Estes apresentam uma alta proporção de reação positiva, sobretudo em pacientes da zona rural, entretanto, a positividade permite apenas a demarcação do provável nicho ecológico do fungo (Londero *et al.*, 1972; Lacaz *et al.*, 1990; Brummer *et al.*, 1993). Com base em dados laboratoriais, o micro-nicho do patógeno deve ser um lugar úmido com pouca variação de temperatura, o que é comum em áreas endêmicas (Restrepo 1985; Restrepo *et al.*, 1994).

Análises comparativas através de Amplificações Randômicas de Sequências Polimórficas de DNA (RAPO) de isolados de *P. brasiliensis* obtidos de tatu e humanos, demonstraram que ambos possuem padrões genotípicos similares sugerindo uma origem comum aos isolados (Ayako *et al.*, 1999).

ASPECTOS MORFOLÓGICOS E DE PAREDE DO *P. brasiliensis*

A fase parasita do fungo caracteriza-se por apresentar células ovais ou alongadas, com duplo contorno com ou sem brotamentos. As colônias apresentam-se com aspecto rugoso e pigmentação cremosa e o crescimento é aparente após alguns dias de incubação no meio de cultivo semi-sólido Fava Neto. O polimorfismo celular dentro de um mesmo isolado de *P. brasiliensis* é bastante elevado, sendo a forma mais característica a em “roda de leme”, com múltiplos brotamentos (Ângulo-Ortega *et al.*, 1971; Lacaz 1991). A fase saprofítica, entretanto, encontra-se sob a forma de filamentos micelianos septados com esporos terminais ou intercalares. O crescimento é lento produzindo pequenas colônias brancas ou marrons, aveludadas e com morfologia irregular (Lacaz 1991).

Análises da composição química da parede celular de ambas as fases (leveduriforme e miceliana) de *P. brasiliensis*, revelam que elas diferem basicamente quanto à disposição estrutural de seus polissacarídeos, sendo quitina um componente comum a elas. A forma leveduriforme apresenta parede constituída basicamente por glucanas, estruturadas como α -(1,3)-glucana em grande quantidade e por β -(1,3)-glucana em menor concentração (San-Blas *et al.*, 1977). Glucana também é a principal hexose na forma miceliana, polimerizada quase que exclusivamente como β -(1,3)-glucana.

FATORES DE VIRULÊNCIA

P. brasiliensis é um patógeno que apresenta perfil de virulência bastante variado. Devido à heterogeneidade genética do hospedeiro e a fatores intrínsecos e

extrínsecos do patógeno, um mesmo isolado do fungo pode apresentar comportamento diferencial de infecção em hospedeiros diferentes (Singer-vermes *et al.*, 1989; Casotto *et al.*, 1991). Dentre as moléculas com reconhecida importância antigênica, a gp43 é específica para o sistema PCM-*P. brasiliensis* (Blotta *et al.*, 1993).

Essa glicoproteína é secretada pelo fungo e a ela são atribuídas várias funções, sendo as de adesão e hidrólise as mais importantes (Restrepo *et al.*, 1994; Moura-Campos *et al.*, 1995). Esta glicoproteína tem ainda a propriedade de se ligar a laminina, como demonstrado por Vicentine *et al.*, 1994. Esta propriedade permite ao fungo manter íntimo contato com os tecidos do hospedeiro e evita que propágulos infectivos sejam deslocados e conseqüentemente eliminados pelo hospedeiro.

Outro fator também relacionado com a virulência do fungo é a termo-tolerância, ou seja, capacidade de crescer a 37 °C. Essa habilidade confere ao patógeno a capacidade de se desenvolver na temperatura imposta pelo hospedeiro. No interstício do hospedeiro, em função da temperatura do corpo, ocorre a diferenciação da forma miceliana para a leveduriforme. O dimorfismo é um evento importante no estabelecimento do fungo no hospedeiro e é também considerado um fator de virulência (Rhodes, 1988). A temperatura do corpo do hospedeiro também induz a síntese de algumas proteínas e glucanas induzidas pelo calor, importantes não unicamente na adaptação térmica, mas também na transição de micélio para levedura (Karokawa *et al.*, 1998; Goldan *et al.*, 1994).

O processo de termo-dimorfismo em *P. brasiliensis* é uma condição essencial para a virulência, entretanto, outros fatores, como fatores nutricionais e a resposta imune do hospedeiro são importantes na diferenciação de micélio para células leveduriformes (Villar *et al.*, 1988). O dimorfismo em alguns fungos patogênicos pode determinar mudanças em componentes de parede celular. Em *P. brasiliensis* esse processo está relacionado com a síntese de α -glucana de parede (San-Blas *et al.*, 1982).

Após diferenciação de micélio para levedura a concentração de α -(1,3)-glucana passa a ser maior que a de β -(1,3)-glucana. Presume-se que esta alteração na composição química da parede celular permite o estabelecimento do fungo no interior do hospedeiro pela proteção que este polímero confere à ação de enzimas digestivas de leucócitos e macrófagos (San-Blas *et al.*, 1982).

INFLUÊNCIA HORMONAL

A incidência da PCM é mais prevalente em homens do que em mulheres. A susceptibilidade à infecção parece estar condicionada a diferenças hormonais entre ambos os sexos. *P. brasiliensis* possui receptores para o hormônio feminino 17- β -estradiol, o que retarda a diferenciação de micélio para levedura. Este atraso no processo de diferenciação permite que as mulheres desenvolvam uma resposta imune eficaz contra o patógeno (Restrepo *et al.*, 1984; Aristizabal *et al.*, 1996; Aristizabal *et al.*, 1998). Antes da puberdade, entretanto, a prevalência da doença para ambos os sexos ocorre com igual frequência devido a baixa concentração desse hormônio (Stover *et al.*, 1986).

DIAGNÓSTICO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

O diagnóstico micológico da PCM é feito por demonstrações microscópicas diretas, histopatológicas e sorológicas do agente etiológico. Em muitos casos, o fungo pode ser diretamente visualizado em espécimes clínicos (saliva, fluído de lavado bronquioalveolar, crosta da base de granuloma, secreção de dreno de nódulos linfáticos e amostras de biópsias de tecidos), utilizando-se preparações com KOH a 10%. O aspecto das células nessas preparações são leveduriformes esféricas com duplo contorno com brotamento único ou múltiplo, conferindo a morfologia conhecida como “roda de leme” (Lacaz *et al.*, 1982; Sidrim *et al.*, 1999). Análises histopatológicas são de fundamental importância na demonstração das formas de granulomas e o tipo morfológico das células existentes nos sítios da infecção (Lacaz *et al.*, 1982).

O diagnóstico sorológico tem sido extensivamente utilizado dado a variedade de apresentações clínicas da micose e o longo tempo requerido para o isolamento do *P. brasiliensis* (Lacaz *et al.*, 1994). A detecção do antígeno diagnóstico da PCM, pela utilização de anticorpo monoclonal anti-gp₄₃ no soro de paciente tem sido

utilizada com bastante eficiência no diagnóstico da PCM (Puccia *et al.*, 1991; Brummer *et al.*, 1993).

TRATAMENTO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Sulfonamida foi o primeiro agente antifúngico introduzido na terapêutica da PCM. Essa droga é recomendada no tratamento de pacientes com doença recente, sobretudo nas formas pulmonar aguda e crônica ou àqueles com intolerância à anfotericina B e ao cetoconazol. Também recomenda-se que o tratamento seja mantido até o desaparecimento total das manifestações clínicas e/ou até o desaparecimento total das manifestações clínicas e/ou até o completo decréscimo nos níveis de anticorpos anti-*P. brasiliensis* no soro de paciente com PCM. A sulfonamida pode também ser utilizada, na manutenção de um tratamento feito anteriormente com anfotericina-B (Mendes *et al.*, 1994; Sidrim *et al.*, 1999). Frequentemente têm-se observado cura clínica em alguns pacientes tratados com a droga, entretanto, posteriores recidivas da doença ocorrem com frequência, em algumas situações podendo levar o paciente a óbito (Mendes *et al.*, 1994).

Empregada pela primeira vez em 1950 a anfotericina B, possui atividade fungistática e fungicida, e quando administrada a pacientes infelizmente pode produzir nefrotoxicidade (Lacaz *et al.*, 1958). Entretanto, esses efeitos colaterais são dose dependente, desaparecendo com a descontinuidade do tratamento. Mesmo ocasionando vários efeitos colaterais é considerada a droga mais eficiente não apenas no tratamento da PCM, como também em outras micoses sistêmicas, sendo indicada para todas as formas da doença (Mendes *et al.*, 1994).

Recentes avanços no tratamento da PCM tem sido obtidos com o uso de compostos azólicos. Dados que datam da década de setenta já demonstravam que o *P. brasiliensis* mostrou-se altamente sensível a essas drogas tanto *in vitro* como *in vivo* (Van-Cutsem *et al.*, 1972; Restrepo *et al.*, 1984). O cetoconazol apresenta boa eficiência *in vitro* e na prática clínica contra o *P. brasiliensis* (Restrepo *et al.*, 1980; Restrepo *et al.*, 1984).

Nos dias atuais o itraconazol é a droga de escolha no tratamento da PCM. Esse agente antifúngico apresenta baixa toxicidade em animais e humanos, também não afetando os níveis hormonais do sangue e não apresentando efeitos colaterais

severos (Negroni *et al.*, 1987; Martins *et al.*, 1997). Outro composto desse grupo utilizado no tratamento da PCM, demonstrando boa eficiência, notadamente pelo curto período de tratamento é o saperconazol (Franco *et al.*, 1992).

O uso de fluconazol no tratamento de pacientes com PCM tem revelado melhora clínica, entretanto, sua ação é lenta quando comparada ao itraconazol (Negroni *et al.*, 1990).

Quanto a profilaxia da doença, o procedimento mais promissor, consiste da utilização de vacinas feitas a partir do antígeno diagnóstico da PCM, a gp₄₃. Esse hapteno imunigênico pode desencadear, em animais, uma vigorosa resposta imune tipicamente celular (Lacaz *et al.*, 2002).

INTERAÇÃO DE *Paracoccidioides brasiliensis* COM O HOSPEDEIRO

Até o presente momento os mecanismos de interação entre o *P. brasiliensis* com seu hospedeiro, não são muito bem conhecidos. Em outros patógenos entretanto, os mecanismos de infecção são melhor compreendidos e acredita-se que o *P. brasiliensis* deva utilizar estratégias semelhantes. Assim postula-se que a presença de mecanismos de complementariedade entre receptores específicos, presentes nas superfícies dos tipos celulares envolvidos no processo infeccioso sejam de fundamental importância para a efetivação da patologia.

Moléculas de superfícies com importância reconhecida no estabelecimento de uma interação, mas sem denominação específica são genericamente chamadas de adesinas. Adesinas compreendem carboidratos, proteínas e glicoproteínas que apresentam papel na adesão e reconhecimento de propágulos do patógeno a seus hospedeiros.

A adesão do patógeno às estruturas do hospedeiro é um dos eventos iniciais no processo patogênico e é de crucial importância para a manutenção dos microrganismos à superfície do sítio de infecção, (Scaletsky *et al.*, 1984; Kennedy *et al.*, 1992). As evidências mais relevantes a respeito de mediadores de adesão envolvem proteínas e glicoproteínas de superfície. Resíduos de carboidratos tipo manose e N-acetil-glicosamina são os mais comumente associados a proteínas que estabelecem elo de aderência entre microrganismos e epitélios.

Complementarmente, carboidratos (manose, N-acetil-glicosamina, galactose e fucose) também atuam como elo de ligação entre células do sistema imune e

microrganismos. Importância maior tem se dado ao envolvimento de mananas e manoproteínas na mediação de adesão, especialmente entre microrganismos e seus hospedeiros.

Um caso especial de glicoproteínas que merecem destaque são as integrinas que possuem ligantes para proteínas tipo fibronectina, laminina, vitronectina e fibrinogênio encontrados comumente na matriz extracelular de células do hospedeiro (Kennedy *et al.*, 1992) e que acredita-se ser um mediador importante de adesão em fungos.

O mecanismo típico de infecção pelo *P. brasiliensis*, inicia-se pela entrada de partículas infecciosas do fungo no hospedeiro. Na PCM, propágulos infectantes de *P. brasiliensis* inicialmente diferenciam para a forma leveduriforme. O dimorfismo apresentado pelo *P. brasiliensis* é uma estratégia do patógeno para evadir-se dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Fatores relacionados à nutrição e temperatura são fundamentais ao estabelecimento do evento de dimorfismo celular apresentado pelo fungo, e seguramente favorecem a infecção do *P. brasiliensis*.

O contato inicial entre propágulos infectantes do fungo e o hospedeiro ocorre nos alvéolos pulmonares. No estudo da PCM, tem-se observado que diferentes isolados de *P. brasiliensis* apresentam comportamentos diferenciais de infecção (Silva *et al.*, 2001), e que, supostamente, estas alterações são decorrentes de modificações ocorridas no arranjo de componentes da parede celular do fungo (Hana *et al.*, 2000).

A gp₄₃, o antígeno diagnóstico da PCM, foi apontada como a principal molécula envolvida no mecanismo que estabelece adesão de *P. brasiliensis* a componentes da matriz extracelular de células epiteliais de mamífero (Vicentini *et al.*, 1994; Vicentini *et al.*, 1997; Shikanai-Yasuda *et al.*, 1997; Kurokawa *et al.*, 1998).

A capacidade invasiva do *P. brasiliensis* constitui um evento multifatorial, que, na maioria das vezes, depende tanto dos mecanismos adaptativos do patógeno (Brummer *et al.*, 1994; Mendes-Giannini *et al.*, 1994), como do sistema de defesa do hospedeiro, representado basicamente por neutrófilos e fagócitos mononucleares (Peryssú 1962; Restrepo *et al.*, 1975; Goihman-Yahr *et al.*, 1990). Outro fator também importante e que pode ser determinante no desenvolvimento da PCM é a capacidade genética do hospedeiro, que irá determinar que tipo de resposta imune deverá ser estabelecida. Outro grupo de mediadores que, supostamente, estão envolvidos no mecanismo de interação do *P. brasiliensis* a células do sistema imune são as frações Fc de imunoglobulinas e receptores do sistema complemento.

O modelo aqui utilizado é o resultado de estudos prévios que permitiram o estabelecimento do perfil de infecção do fungo em células LLM-CK₂, Vero e CCL-6 *in vitro* (Silva *et al.*, 2001). Observamos que a interação entre células CCL-6 e o isolado Pb₁₈ do fungo era a mais adequada para este tipo de abordagem experimental. Desta interação os eventos de adesão internalização e multiplicação do patógeno são conspicuamente observáveis. Trabalhos ultraestruturais subseqüentes utilizando o modelo, realizados por Jorge *et al.*, (2004), mostraram que o fungo cresce em íntimo contato com a célula CCL-6 hospedeira e raramente ocasiona a lise celular. A validade do modelo de infecção artificial em monocamadas de células CCL-6 foi aferida nos trabalhos de Lyon *et al.*, (2004), que testou isolados clínicos recentes de pacientes apresentando quadros de paracoccidiodomicose diversos e observou que isolados de pacientes, aparentemente, com doença mais severa, também possuíam mais eventos de adesão e intrnalização em células CCL-6.

MEDIADORES DE ADESÃO CELULAR

Várias são as moléculas descritas como importantes mediadores da adesão celular, tais como: intgrinas, fibronectina, vitronectina, laminina, carboidratos e lectinas. Essas moléculas são expressas na superfície de vários tipos celulares, com funções na adesão célula-célula e célula-matriz extracelular. O evento de adesão é o passo inicial para a colonização e estabelecimento definitivo de um organismo em seus hospedeiro, sendo também importante na efetivação de outros eventos biológicos como: morfogênese, crescimento, organização estabilidade tecidual, inflamação e resposta do hospedeiro às infecções (Hynes *et al.*, 1987).

INTEGRINAS

Integrinas são glicoproteínas transmembrana, compostas por dois heterodímeros, α e β , não covalentemente ligados, associadas por um domínio globular amino terminal (Smith *et al.*, 1988). Essas moléculas foram inicialmente isoladas de fibroblastos de embrião de aves e e células de mamíferos, e mais recentemente, de alguns fungos (Corrêa *et al.*, 1996), protozoários e plantas. Muitos tipos celulares expressam vários tipos de integrinas que reconhecem ligantes de superfície celular e matriz extracelular (EMC). Apresentam funções importantes na diferenciação e comunicação celular. As subunidades (α e β) exibem um grande domínio extracelular, rico em cisteína, e outro pequeno dentro do citoplasma, contendo resíduos de tirosina e um sítio de fosforilação de tirosina quinase (Hynes 1987).

Estruturalmente, as subunidades β de todas integrinas são similares, apresentando sequências homólogas de aminoácidos, muitos resíduos de cisteína organizados em quatro unidades repetidas. Quanto às subunidades α , essas são compostas por uma cadeia leve e uma pesada, ligadas por pontes de dissulfeto, contendo um curto domínio citoplasmático carboxílico terminal e um grande domínio extracelular (Hhemler *et al.*, 1990; Albelda *et al.*, 1990).

A adesão celular mediada por integrinas é um processo que requer energia e é depende de cátions divalentes extracelulares (Diamond *et al.*, 1994). Algumas integrinas requerem inicialmente ativação para posterior aderência e ancoragem a ligantes específicos na matriz extracelular. Essa ativação induz mudanças na conformação da integrina, o que ocasiona sua conexão com proteínas do citoesqueleto tais como vinculina, talina, actina e α -actina (Horwitz *et al.*, 1986).

As principais funções biológicas definidas e conhecidas das integrinas são o reconhecimento célula-célula, célula-matriz extracelular, ancoragem estável de queratinócitos sobre a membrana epidérmica basal, movimentação de leucócitos através do endotélio e diferenciação celular. A distribuição e atividades das integrinas podem ser reguladas por uma dinâmica bidirecional através da membrana plasmática, ou por mudanças em sua conformação (Humphries *et al.*, 1998).

Algumas integrinas foram identificadas por sua habilidade de ligar-se a glicoproteínas da matriz extracelular que, na maioria das vezes ocorrem através de um sítio contendo uma sequência peptídica arginina-glicina-ácido aspártico (RGD)

(Hynes 1987). Um segundo resíduo comum, denominado (LDV) foi caracterizado como um sítio ativo na adesão de imunoglobulina com integrinas. Diferente da RGD, que é invariante em sua sequência, o peptídeo LDV varia em torno de um *consensus* limitado. Estes ligantes estão presentes em várias estruturas celulares, entre elas, as moléculas de fibronectina, vitronectina, colágeno etc.

Fibronectinas são glicoproteínas que estão envolvidas em uma ampla variedade de propriedades celulares, particularmente aquelas envolvidas na interação de células com a matriz extracelular. Estas propriedades incluem, adesão celular, morfogênese, organização do citoesqueleto, migração, diferenciação, transformação oncogênica, fagocitose e hemostasia (Hynes *et al.*, 1982).

Em animais, a fibronectina é encontrada em fluídos do corpo, na matriz do tecido conectivo mole e na maioria das membranas basais, sendo sintetizadas por uma ampla variedade de células. Fibroblastos e células endoteliais são as maiores produtoras, mas muitos outros tipos celulares, incluindo algumas células epiteliais, sintetizam fibronectina em baixos níveis. Existem basicamente dois tipos de fibronectina, uma celular e uma outra plasmática. A celular é encontrada em múltiplas formas, entretanto, são muito similares quanto à estrutura e propriedades. A plasmática existe como uma proteína solúvel, enquanto que a aparência típica da fibronectina celular é semelhante a uma matriz extracelular (Hynes *et al.*, 1982).

Com base em suas propriedades, são moléculas assimétricas, consistindo de duas sub-unidades similares e idênticas de peso molecular entre 20 a 220 kD, unidas por ponte de dissulfeto próxima ao seu terminal carboxílico. Análises biofísicas indicam que embora a molécula como um todo seja flexível, contém um domínio globular compacto (Alexander *et al.*, 1978; Alexander *et al.*, 1979). Uma importante característica de fibronectinas é sua capacidade de interagir com várias macromoléculas ocasionando adesão célula/célula, célula/substrato (plástico, colágeno, gelatina e fibrina), crescimento celular e regulação de diferenciação celular (Grinnell 1978).

Estruturalmente as fibronectinas (plasmática e celular) são moléculas delgadas e alongadas, com regiões flexíveis, embora, em algumas situações, possam apresentar-se globulares (Engel *et al.*, 1981; Erickson *et al.*, 1981). A região polipeptídica flexível da fibronectina, local que contém sítios de ligação específicos, é susceptível à clivagem da glicoproteína por proteases. Essa proteína contém aproximadamente 5% de carboidratos, que são exclusivamente oligossacarídeos ligados a resíduos de asparagina (Hynes *et al.*, 1982).

Outro ligante de integrinas, a vitronectina é uma glicoproteína multifuncional presente no sangue e na matriz extracelular (EMC). Liga-se a glicosaminoglicanas, colágeno, complemento, heparina e ao complexo trombina/antitrombina, a receptor de urokinase e estabiliza a conformação inibitória do inibidor-1 de ativação do plasminogênio. Por estar localizada na matriz extracelular e por ligar-se ao inibidor de ativação do plasminogênio, vitronectina pode potencialmente regular a degradação proteolítica da MEC (Schvartz *et al.*, 1999).

Além do segmento amino terminal idêntico ao da somatomedina-B, vitronectina possui uma sequência RGD (Arginina-Glicina-Ácido aspártico), que media adesão da célula à matriz extracelular, via receptores específicos de integrinas. Adjacente à sequência RGD, normalmente, a molécula apresenta dois resíduos de sulfato de tirosina. Esse segmento está envolvido na ligação de vitronectina ao complexo trombina/antitrombina III, e na neutralização de parte de seu domínio policional, presente no grupo carboxílico terminal. Vitronectina adere ao colágeno, especificamente, por meio de grupos funcionais de duas regiões, uma adjacente à sequência de RGD e outra próxima ao domínio de ligação à heparina. Possui duas sequências para fosforilação de proteínas quinases C (Schvartz, *et al.*, 1999).

Sendo uma proteína predominantemente encontrada no plasma sanguíneo, ela é presumivelmente estabilizada por interações iônicas entre seus segmentos polianiônicos e policatiônicos. Entretanto, no sangue humano, ela pode ser encontrada sob as formas de cadeia única e cruzada com duas cadeias (Seiffert, 1997).

Sua função biológica é fornecer um elo regulador entre a adesão celular e a proteólise fisiológica. Ela está ancorada à matriz extracelular via colágeno ou a domínio de ligação à heparina, promovendo adesão celular, crescimento e migração por interagir com integrinas tipo $\alpha\beta 3$ (Hess *et al.*, 1995). A adesão celular via vitronectina, leva ao estabelecimento de um complexo mecanismo de sinalização que ocasiona a reorganização do citoesqueleto, o transporte de íons intracelulares, o catabolismo de lipídios e a expressão gênica (Meredith *et al.*, 1996). A vitronectina também age como inibidor das reações citolíticas do complexo terminal do complemento e perforina, bem como na formação e dissolução de coágulo sanguíneo. Sua fosforilação é um evento inicialmente detectado em resposta à estimulação mitogênica, assim levando à ativação da via transducional por proteína quinase (Schvartz *et al.*, 1999).

Lamininas são glicoproteínas da matriz extracelular (EMC), importantes no desenvolvimento e manutenção da organização celular. Suas funções estão relacionadas à estimulação de crescimento, diferenciação e mediação da comunicação celular. Ela é a primeira proteína da EMC detectada durante a embriogênese, modulando a adesão celular e mantendo os estágios de diferenciação de células epiteliais e endoteliais (Beck *et al.*, 1990). Laminina foi inicialmente isolada de tumor de Engelbreth Holm-Swarm (EHS) e de depósitos extracelulares de células de carcinoma de camundongo (Chung *et al.*, 1979).

A estrutura usual dessa glicoproteína é em forma de cruz, sendo três braços curtos e aparentemente idênticos e um longo (Engel *et al.*, 1981). Dois dos três braços curtos contêm regiões globulares centrais e terminais, separadas por uma estrutura semelhante a um bastão, enquanto o braço longo flexível, e contém uma região globular adicional (Beck *et al.*, 1990).

Laminina exibe uma variedade de atividades biológicas, incluindo adesão celular, crescimento, diferenciação de vários tipos celulares e pode estabelecer múltiplas interações entre componentes da membrana basal de vários tipos celulares (Timpl *et al.*, 1986). Interessantemente, a glicoproteína diagnóstica gp₄₃ de *P. brasiliensis* apresenta a capacidade de se ligar à laminina. Acredita-se que essa glicoproteína possa atuar como um mecanismo de reconhecimento/adesão (Vicentini *et al.*, 1994).

CARBOIDRATOS

Além de sua função estrutural, carboidratos são os principais substratos envolvidos em processos bioquímicos orgânicos, como a glicólise, fermentação alcoólica e láctica. São fundamentais nos processos de obtenção de energia para fungos, bactérias e animais. São substâncias eminentemente energéticas para os organismos, entrando nos processos bioquímicos de óxido-redução. Carboidratos servem como elementos estruturais, encontrados nos organismos humanos livres ou combinados a proteínas (glicoproteínas). Entram também na composição da membrana citoplasmática, núcleo, organelas celulares, sendo substâncias de destacada importância biológica.

Muitos carboidratos encontrados na natureza ocorrem como polissacarídeo de sítio peso molecular. A hidrólise completa de um polissacarídeo por enzimas ou ácidos específicos produz monossacarídeos e ou derivados de monossacarídeos. D-glicose, D-manose, D-frutose, D e L-galactose D-xilose e D-arabinose são as unidades monossacarídicas mais prevalentes em polissacarídeos. Os derivados monossacarídicos comumente encontrados como produtos da hidrólise de um polissacarídeo natural são D-glicosamina, D-galactosamina, ácido D-glicurônico, ácido N-acetilmurâmico e ácido N-acetilneurâmico. Polissacarídeos típicos encontrados na parede celular de fungos denominados de glucanas diferem de outros polissacarídeos, quanto ao arranjo das unidades repetidas de monossacarídeos, tamanho de sua cadeia e o grau de ramificação. Eles são divididos em homopolissacarídeos, que consistem de uma única unidade monomérica, e heteropolissacarídeos, que contém duas ou mais unidades monoméricas diferentes (Lehninger 1971).

Reconhecidamente, carboidratos são moléculas presentes na superfície de vários tipos celulares. Servem como ponto de aderência entre células/célula, em infecções envolvendo microrganismos, toxinas, hormônios e outras moléculas e geralmente estão associados a proteínas do soro, a matrix extracelular e lipídeos na superfície celular. Carboidratos também são encontrados associados a proteínas no interior de muitas células, dentro do núcleo e no citoplasma (Drickamer 1988). Aproximadamente 80% da parede dos fungos é formada de carboidratos, dispostos em polímeros ramificados e não ramificados sob a forma de glucanas, mananas e N-acetil-glicosamina (Chaffin *et al.*, 1998).

Dentre as funções biológicas relacionadas aos carboidratos convém citar a adesão celular, adesão de célula à matriz extracelular, reconhecimento de receptores de superfície celular, modulador de diferenciação e determinantes antigênicos (Drickamer, 1988).

LECTINAS

Lectinas são proteínas não enzimáticas, de origem não imune, que seletivamente se ligam a carboidratos específicos e estão presentes na maioria dos seres vivos. Elas foram originalmente isoladas de plantas, onde são encontradas em

grandes quantidades em muitas sementes. Inicialmente, as lectinas foram descritas como glicoconjugantes que de um modo similar à interação antígeno-anticorpo, aglutinavam células ou formavam precipitados. Entretanto, muito embora as lectinas possam aglutinar alguns tipos celulares, esse evento não é um pré-requisito necessário na classificação dessas proteínas, uma vez que algumas não possuem essa capacidade (Hynes *et al.*, 1982).

Vários eventos de reconhecimento celular são modulados por lectinas. Mais recentemente, as lectinas foram demonstradas em muitos outros organismos, incluindo mamíferos. Algumas delas ocorre na superfície celular e são idealizadas como estando envolvidas no reconhecimento celular. Deste modo, lectinas se ligam as glicoproteínas da superfície celular, proteoglicanas e glicolípides. Elas são amplamente usadas como ferramenta bioquímica na biologia celular para localizar e isolar moléculas da membrana plasmática contendo açúcar (Alberts *et al.*, 1989).

Várias funções biológicas são atribuídas às lectinas, entre elas: capacidade de aglutinação a eritrócitos, plaquetas e linfócitos, identificação de carboidratos de superfície que agem como receptores de adesão celular (Andrews *et al.*, 1999) etc. As lectinas são semelhantes entre si quando comparadas suas propriedades físico-químicas, embora sejam diferentes na especificidade para carboidratos. Elas consistem de duas ou quatro subunidades, com massa molecular relativa de 30 KDa, cada uma contendo um sítio de aderência a carboidratos. A interação com o açúcar requer a participação de íons de cálcio e magnésio (Yamamoto *et al.*, 2000).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Catacterizar “*in vitro*” mediadores moleculares importantes no processo de infecção de *Paracoccidioides brasiliensis* em células de mamíferos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar a participação a capacidade de carboidratos e proteínas em atuar como mediadores de adesão do *P. brasiliensis* à células epiteliais CCL-6 em cultura.

Investigar a presença de receptores semelhantes a carboidratos e a integrinas em células leveduriformes do *P. brasiliensis*.

Determinar os efeitos biológicos do sobrenadante de cultura do *P. brasiliensis* em mediar sua adesão a células epiteliais CCL-6.

Estabelecer a natureza e estrutura química de moléculas secretadas pelo *P. brasiliensis* com atividade em reduzir sua aderência a células CCL-6.

MATERIAIS E MÉTODOS

ISOLADO DE *Paracoccidioides brasiliensis* E CÉLULAS HOSPEDEIRAS HENLE-407 (ATCC-CCL-6)

Paracoccidioides brasiliensis 18 (**Pb₁₈**) é um Isolado fúngico obtido a partir de espécime clínico de paciente com paracoccidioidomicose e mantido rotineiramente no Laboratório de Mecanismos Gerais de infecções Fúngicas, do Departamento de Microbiologia, no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) – UFMG, através de repiques sucessivos em meio Fava-Neto ou RPMI.

HENLE-407 (ATCC-CCL-6) – Célula epitelial obtida a partir de tecido embrionário do intestino humano sadio. Linhagem cedida gentilmente pela Dra. Judith A. Appleton do Colégio de Medicina Veterinária – Universidade de Cornell – USA.

MANUTENÇÃO DE *P. brasiliensis* EM CULTURA

O isolado Pb₁₈ foi mantido em fase leveduriforme em meio de cultura semi-sólido Fava Neto (Fava Neto, 1961). Após repiques sucessivos, geralmente feitos em duplicata, tubos contendo o fungo foram mantidos a 37 °C por períodos variando entre 15 a 20 dias, dependendo do crescimento por ele apresentado. Quando as colônias fúngicas apresentavam um padrão bom de crescimento, elas foram preservadas a 4 °C sob uma camada de óleo mineral.

Antes dos experimentos de interação, o isolado em crescimento exponencial, mantido em meio Fava Neto foi transferido para o meio RPMI 1640 (R-6504-Sigma), suplementado com 0,016 M de HEPES (Atlanta), Bicarbonato de Sódio 0,02 M (Synth), 10% de Soro Fetal Bovino inativado (Nutricell) e 60 mg de Gentamicina (Ariston), e mantidos sob agitação e 130 g por 7 dias. Para obtenção de sobrenadantes de cultura do fungo, o isolado foi cultivado sob a mesma condição anteriormente descrita, entretanto, em meio (RPMI) sem soro fetal bovino.

O isolado de *P. brasiliensis* (Pb₁₈), antes das infecções, foi submetido a teste de viabilidade segundo Calich *et al.*, (1978) com algumas modificações. Para tanto, alíquotas de 500 µl da suspensão fúngica, cultivada em meio de interação (RPMI-completo) foi centrifugada a 5000 g por 10 min. Após centrifugação, o sobrenadante

foi descartado e o inoculo fúngico ressuspenso em 400 µl de PBS (0,1 M; pH 7,2). Um volume de FDA/BE – (FDA – 0.005 mg/ml (Diacetato de fluoresceína (IGN biomedicls), BE – 20 µg/ml (Brometo de etidium – Sigma) foi adicionado a igual volume de suspensão fúngica e mantido em local escuro por 30 min. Após esse tempo o material foi montado em lâmina/lamínula e analisado em microscopia de fluorescência (490/520 nm excitação/emissão – Olympus BX-41).

Os testes de viabilidade de células CCL-6 foram realizados na presença de azul de Tripán a 0,4%. Para tanto, as monocamadas de células foram submetidas ação de tripsina e uma alíquota de uma solução de 0,4% de azul de tripan foi adicionada. As células que após o tratamento apresentaram-se pigmentadas de azul foram consideradas inviáveis e as não pigmentadas, viáveis.

MANUTENÇÃO DA LINHAGEM CCL-6 EM CULTURA

Após descongelamento, linhagem celular hospedeira foi mantida em meio de cultura RPMI 1640 (R-6504 – Sigma), suplementado com 0,016 M de HEPES (Atlanta), Bicarbonato de Sódio 0,02 M (Synth), 10% de Soro Fetal Bovino (Nutricell) e 60 mg/L de Gentamicina (Ariston) em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, em garrafas com capacidade de 25 ou 50 ml. A manutenção das células em cultura foi realizada através de repiques sucessivos. Para tanto, quando necessário, as culturas foram submetidas a tripsinização, quantificação e a teste de viabilidade (azul de Tripán a 0,4%). As concentrações celulares foram estimadas em câmara de Neubauer, e ajustadas para 10⁵ células / ml.

OBTENÇÃO DE SOBRENADANTE TOTAL E FRACIONADO DE CULTURA DE *P. brasiliensis*

O isolado de *P. brasiliensis* em fase exponencial foi mantido sob condições de cultivo em meio RPMI 1640 sem soro fetal bovino por 7 dias. Após esse tempo as suspensões fúngicas foram alíquotadas em tubos Falcon de 50 ml e centrifugadas a 10.000g por 10 min a 25 °C. O sobrenadante obtido foi filtrado em membrana Millipore 0,2 µm. A fração protéica do sobrenadante foi obtida por precipitação em sulfato de amônio a 80%. As frações protéicas e não protéica do sobrenadante

foram submetidas a diálise contra PBS 0.1 M por 48 h com substituição do tampão 2 vezes ao dia. Os volumes finais após as diálises foram reduzidos em 10 vezes através de diálise contra PEG/6000 cristalino (polietilenoglicol-6000-Synth). Estas frações foram mantidas em *freezer* a -20 °C até utilização nos experimentos.

Proteínas totais do fungo foram obtidas em presença de nitrogênio líquido (N₂). Para tanto, células leveduriformes foram masceradas em presença de N₂, seguido da ressuspensão em tampão de extração (Tris-HCL 50 mM pH 7,4, 0,1 % PMSF, 0,05% de NaN₃, Ácido cítrico 1 mM, EDTA 0,01%) segundo Corrêa *et al.*, (1993). O mascerado de células fúngicas foi filtrado em membrana esterilizante com 0,22 µm de porosidade.

DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Proteínas obtidas de sobrenadantes de cultura líquida e de células totais de *P. brasiliensis* foram dosadas segundo método estabelecido por Bradford (1976). Para tanto, as amostras de proteínas foram postas em placa de microtitulação, diluída na proporção de 1:10. Para a estimativa da concentração protéica, a absorbância medida na amostra foi interpolada contra a equação de concentração obtida pela regressão de absorbância obtida de uma solução padrão cuja concentração variou de 10 µg/ml até 1 mg/ml. As concentrações de proteínas foram estimadas em programa Labsystems Genesis V2.16, em filtro de 595 nm.

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-gp43

Camundongos da linhagem *Swiss*, antes da inoculação de hibridomas (17-D – secretor de IgG anti-gp43), cedido gentilmente pela Prof^a Dra. Patrícia Silva Cisalpino do Departamento de Microbiologia ICB/UFMG, foram sensibilizados com óleo mineral estéril. Para tanto, 0,5 ml do óleo foram introduzidos na cavidade peritoneal dos animais. Após 7 dias de sensibilizados, 0,5 ml de suspensão celular de hibridoma 17-D a uma concentração de 5 x 10⁶/ml, previamente mantido em cultura, foram inoculados na cavidade peritoneal dos animais.

Os animais foram observados diariamente até apresentarem completa dilatação do abdomen. A obtenção do líquido ascite foi realizada por punção da cavidade abdominal do animal, pela utilização de uma agulha com dimensões de 1,2 mm X 25 mm. O material obtido foi centrifugado a 1000 x g por 5 min. Os sobrenadantes, contendo os anticorpos, foram aliquotados e mantidos a -20°C. Os hibridomas obtidos do líquido ascite, em sua maioria, foram novamente inoculados em outros animais previamente sensibilizados ou ressuspensos em meio RPMI e mantidos em cultura até posterior congelamento em N₂ líquido.

Um outro anticorpo utilizado nos testes imunocitoquímicos (anticorpo policlonal anti-Pb-total obtido de coelho) foi cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Alfredo Goes, do Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB/UFMG.

INTERAÇÃO DE *P. brasiliensis* COM CÉLULAS CCL-6

Antes das interações, os tipos celulares envolvidos nas infecções tiveram suas concentrações celulares estimadas e submetidas a teste de viabilidade como anteriormente descritos. As concentrações adequadas de células viáveis necessárias às interações foram definidas em percentuais acima de 85% para o fungo e 95% para as células hospedeiras. A proporção de células do fungo para células hospedeiras foi de 1:10. O processo de interação consistiu da inoculação de 2 ml da suspensão fúngica sobre monocamadas de células CCL-6 cultivadas em lamínulas 24 X 24 mm em placas com 6 poços. O tempo de interação nos experimentos de modulação de adesão foi de 6h.

ENSAIO DE IMUNOLocalização

Monocamadas de células CCL-6 com propágulos de *P. brasiliensis* aderidos foram inicialmente fixadas como anteriormente descrito. Após fixação, lamínulas com interações celulares foram tratadas com soros anti-Pb-total de coelho e anti-gp43 de

camundongo diluídos respectivamente a 1/100 e 1/10, suplementados com 5% de BSA (Sigma) a temperatura ambiente por 3h. Os preparados foram lavados 3 vezes em PBS (0,1M, pH 7,2) e incubados com anticorpos anti-IgG de coelho e camundongo respectivamente conjugados com FITC (Sigma) diluído 1:20, suplementado com 5% de BSA por 3h. As observações das interações foram realizadas em microscopia fluorescente (490/520 nm excitação/emissão – Olympus BX-41). Quando necessário, as células marcadas foram fotografadas por meio de um sistema de análise de imagens acoplado ao microscópico.

MODULAÇÃO DE ADESÃO MEDIANTE O USO DE CARBOIDRATOS

Os carboidratos D-manose, N-acetil-glicosamina, D-glicosamina, D-galactosamina, D-fucose e sorbitol foram adicionados ao meio de interação. As concentrações dos açúcares utilizadas foram 25, 50 e 75 mM para D-manose, N-acetil-glicosamina, D-fucose e sorbitol e para D-glicosamina, D-galactosamina foram 5, 10 e 25 mM.

Os peptídeos GRGDSPK (glicina, arginina, glicina, ácido aspártico, serina, fenilalanina e lisina) GRGDTP (glicina, arginina, glicina, ácido aspártico, treonina e fenilalanina) e GRDGS (glicina, arginina, ácido aspártico, glicina e serina) – Phoenix Pharmaceuticals, Inc) foram utilizados na concentração de 500 µg/ml, no tratamento de inóculos do fungo, por 1 h antes das interações. Após 6 h de interação as lamínulas contendo as preparações foram fixadas em paraformaldeído a 4% e gluteraldeído a 2,5% por 1 h, para posterior observação.

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram também tratadas com anticorpos monoclonal anti-gp43 e policlonal Pb-total diluídos nas proporções de 1:10 e 1:100, respectivamente, em meio RPMI, por 1 h. Após esse tempo, as suspensões fúngicas foram centrifugadas a 5000 g por 8 min. Os sobrenadantes foram descartados e os inóculos do fungo ressuspensos em volume igual ao inicial em RPMI. Alíquotas de 300 µl dessas suspensões foram adicionadas a poços de placas de microtitulação, contendo as monocamadas de células hospedeiras aderidas em lamínulas circulares com 13 mm de diâmetro. Após 6 h, as lamínulas foram retiradas, lavadas 3 vezes em RPMI e fixadas como anteriormente descrito. Os eventos de adesões foram analisados contados em microscópio ótico.

MARCAÇÃO DE CÉLULAS DE *P. brasiliensis* COM LECTINAS FLUORESCENTES

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram tratadas com as lectinas (*Wheat germ agglutinin* (WGA), Concanavalina A (ConA), *Arachis hypogea* (PNA) and *Glycine Max* (SBA) – EY Laboratories, Inc – Califórnia, USA) marcadas com FITC – EY Laboratories, Inc, Califórnia – USA), na concentração de 100 µg/ml diluída em RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,0005% de Mg²⁺ e Ca²⁺ por 1 h ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Após esse tempo as células fúngicas foram lavadas 3 vezes e RPMI e observadas para fluorescência (Olympus BX-71 – filtro WB).

AS células do fungo, marcadas com lectinas foram fotografadas por meio de um sistema de análises de imagens acoplado ao microscópico (OLYMPUS BX-71-filtro WB).

MARCAÇÃO DE *P. brasiliensis* COM ANTICORPOS ANTI-INTEGRINAS FLUORESCENTES

Células leveduriformes de *P. brasiliensis*, mantidas em cultura por 7 dias em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino a 10%, foram tratadas com anticorpos monoclonais anti-CD18 de camundongo e humano (cedidos gentilmente pelo Prof. Mauro Martins Teixeira do Depto. de Bioquímica e Imunologia – ICB/UFMG) e policlonais anti-integrina β_2 de caprino (Santa Cruz Biotechnology, Inc) e β_1 de coelho (cedidos gentilmente pelos Profs. Gregory Thomaz Kitten do Depto. de Morfologia ICB/UFMG e Erna Geessien Kroon do Departamento de Microbiologia ICB/UF/MG, respectivamente. Os anticorpos foram , diluídos 1/50 em PBS (0,1 M) acrescido de 5% de BSA e incubados por 3 h 4 °C com as células leveduriformes. Após esse tempo as células fúngicas foram lavadas 3 vezes em PBS e uma segunda incubação foi realizada em presença de anticorpos anti-IgG de camundongo – Sigma, anti-IgG de caprino – Santa Cruz Biotechnology, Inc e anti-IgG de coelho – Sigma, diluídos respectivamente para 1/150, 1/300 e PBS 0,1 M

acrescido de 5% de BSA, por 3 h a 4 °C. As células marcadas foram observadas para fluorescência (Olympus BX-71-filtro WB).

ENSAIO DE INIBIÇÃO DE ADESÃO DE *P. brasiliensis* EM CÉLULAS CCL-6

Monocamadas de células hospedeiras foram tratadas com sobrenadante total e fracionado (porção protéica e não protéica) diluídos (vol/vol) em meio RPMI sem soro fetal bovino, por 2 h. Após esse tempo, as monocamadas foram lavadas 3 vezes em meio RPMI estéril. Os inóculos do fungo e das células hospedeiras utilizados nas interações foram ajustados como descrito anteriormente. Após 6 h de interação, lamínulas com o material foram retiradas e fixadas em solução fixadora.

FIXAÇÃO DAS INTERAÇÕES CELULARES ENTRE CÉLULAS HOSPEDEIRAS E *P. brasiliensis*

Após término dos tempos de infecções previamente estabelecidos, lamínulas contendo as interações celulares foram retiradas dos poços das placas de cultura, lavadas em meio RPMI e tratadas em solução fixadora (paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5 %). O tratamento basicamente consistiu em verter as lamínulas sobre 150 µl da solução fixadora por 1 h. O material fixado foi mantido em PBS (0,1M; pH 7,2) suplementado com 0,005 % de azida sódica em placas de culturas até posterior análises das interações.

ANÁLISES MICROSCÓPICAS DAS INTERAÇÕES CELULARES

Após 6h de infecção, lamínulas contendo os tipos celulares envolvidos nas interações foram retiradas dos poços de placas de culturas e lavadas 3 vezes em RPMI e fixadas em paraformaldeído e glutaraldeído por 1h. Após fixação foram mantidas em PBS a 0,1 M com 0,005% de azida sódica. Análises posteriores das interações foram realizadas em microscópio óptico invertido (OLYMPUS BX-71), em contraste de fase. Foram analisados 50 campos aleatórios por lamínulas e as contagens feitas em triplicata.

CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

A fração não protéica, obtida a partir do sobrenadante de cultura líquida de *P. brasiliensis*, foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna de gel de Sepharose com Concanavalina-A imobilizada (Pharmacia Biotech, Lote-71-7077-00 – Edition AC). Após montagem da coluna, 1 ml da amostra foi aplicado à coluna de cromatografia. A eluição do material ligado a ConA foi realizada por uma solução de *Methyl- α -D-Mannopyranosyl* a 100 mM (Sigma) em tampão Tris-HCl 20 mM contendo 0,5M de NaCl, 1 mM²⁺ e 1mM de Ca²⁺ pH 7.0. As frações obtidas antes, durante e após cromatografia foram analisadas em espectrofotometria em comprimento de onda entre 200 e 350 nM com absorvância máxima de 1000 A (UV-VIS – Spectrophotometer – UV-1201 – SHIMANZU). Após as análises espectrofotométricas as porções coletas foram submetidas à diálise contra tampão Tris-HCL 20 mM contendo 15 mM de NaCl.

CROMATOPLACA

Após formação de uma camada de sílica gel previamente ativada a 100 °C em placa de vidro de 5 X 12 cm, 2 alíquotas de 50 μ L da amostra de proteína obtida do

sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis* foram aplicadas em 2 pontos, na extremidade da placa, para deslocamento por capilaridade. Após cromatografia, os cromatogramas foram pulverizadas com Reagente de Jones – (264 g de Trióxido de cromo dissolvidos em 400 mL de água destilada e adicionado de 230 mL de H₂SO₄ concentrado. A solução formada foi diluída para 1000 mL com água destilada), para a detecção de carboidratos ou glicosídeos ou com o Reagente de Dragendorff – (Solução A: Nitrato básico de bismuto (1,7 g) dissolvido em solução de ácido acético: água na proporção de (1,4); Solução B: Solução aquosa de iodeto de potássio a 40%, solução final utilizada na pulverização: 5,0 mL de A; 5,0 mL de B; 20,0 mL de ácido acético e 70,0 mL de água) para detecção de alcalóides e peptídeos.

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DA MOLÉCULA SECRETADA PELO *P. brasiliensis* EM CULTURA

Os espectros de RMN de ¹H, RMN de ¹³C foram obtidos em espectrômetros da Bruker modelos DX -200 (200MHz) e DRX-400 (400MHz) linha AVANCE, (Departamento de Química – ICEX – UFMG).

ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO DA MOLÉCULA SECRETADA PELO *P. brasiliensis* EM CULTURA

Os espectros foram obtidos em equipamentos Shimadzu/IR-408. A amostra foi analisada em pastilhas de KBr, (Departamento de Química – ICEX – UFMG).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os estudos comparativos das cinéticas de infecções em função da utilização dos competidores de inibição de adesão foram realizados pelo teste *t* de *Student*, dentro de significância $P < 0,05$.

RESULTADOS

INTERAÇÃO *P. brasiliensis* E CÉLULAS CCL-6

Células de *P. brasiliensis* não aderidas à monocamada apresentaram a morfologia típica de roda de leme (Figura 1^a). Quando aderidas, por outro lado, células de *P. brasiliensis* apresentaram múltiplos brotamentos alongados (Figura 1b) e, não raro, estes prolongamentos aparentemente se projetavam sob a monocamada de células CCL-6 (seta Figura 1b). A presença de prolongamentos do fungo no interior da monocamada foi melhor visualizadas pelo tratamento das preparações com anticorpos anti- *P. brasiliensis* fluorescentes (Fig. 1c). Observou-se que os propágulos externos apresentaram-se fluorescentes como o esperado. Entretanto, boa parte dos prolongamentos não apresentaram-se fluorescentes em decorrência da inacessibilidade do anticorpo fluorescente às estruturas fúngicas internalizadas na monocamada. É importante ressaltar que não se observou lesão na monocamada no período de 6 h de observação.

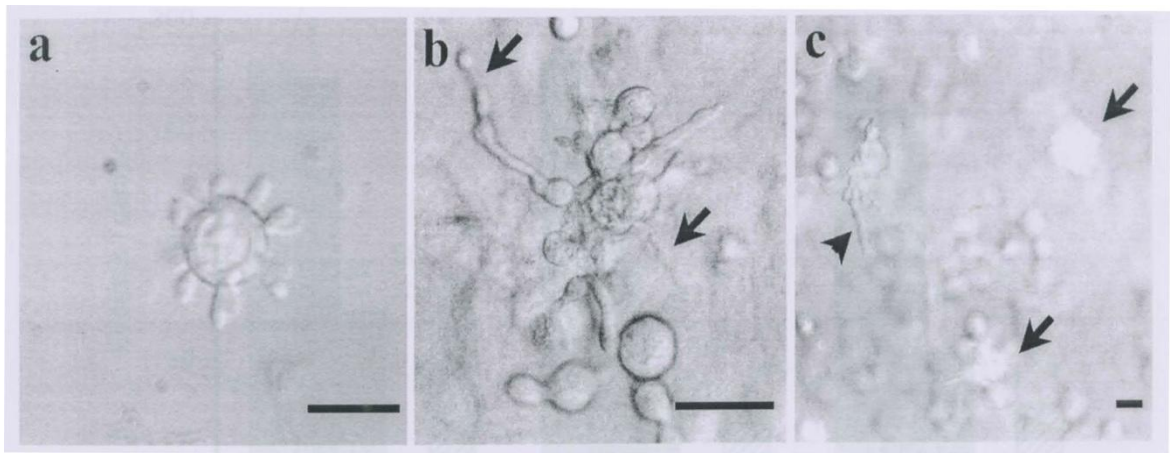


Figura1: Fotomicrografias no modo Nomarsky de células de *P. brasiliensis* aderidas ou não em monocamadas de células CCL-6, após 6 h de inoculação. a) Célula de *P. brasiliensis* não aderida. B) células fúngica aderidas com estruturas internalizadas (seta) e c) células aderidas tratadas com anticorpo anti-Pb-total fluorescente. Note a marcação fluorescente de propágulos externos (seta) e brotamentos internalizados (cabeça de seta) não fluorescentes. Barra = 10 μ m.

INIBIÇÃO DE ADESÃO DO *P. brasiliensis* EM CÉLULAS CCL-6 PELO USO DE CARBOIDRATOS

Para investigar o efeito de monossacarídeos em competir por receptores na interação de *P. brasiliensis* a células CCL-6, Sorbitol, N-acetil-glicosamina, D-manose e D-fucose foram adicionados ao meio de interação. Quando da adição de sorbitol, não se observou modificações na quantidade de propágulos de *P. brasiliensis* aderidos às células hospedeiras em relação ao observado para as células sem a adição do açúcar. Tratamentos com N-acetil glucosamina, D-manose e D-fucose, por outro lado, diminuíram significativamente a adesão de *P. brasiliensis* à monocamada (Figura 2). A diminuição da adesão foi dose dependente e não foi observado, nas concentrações testadas, nenhuma alteração nas monocamadas devido à presença dos açúcares.

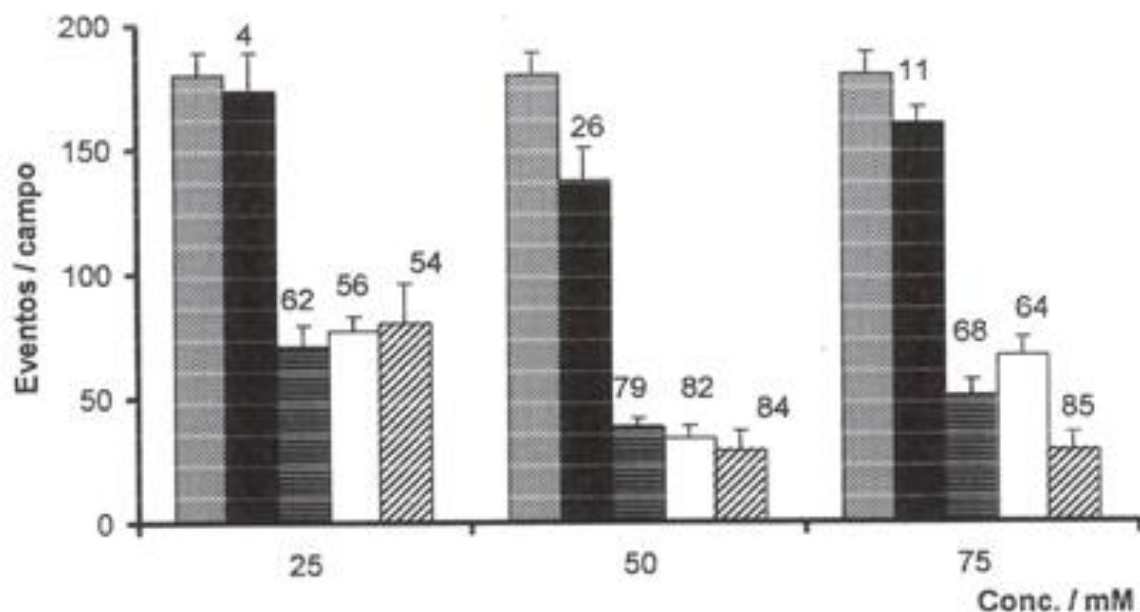


Figura 2. Número de eventos de adesão por campo microscópico de propágulos de *P. brasiliensis* à monocamada de células CCL-6 após o tratamento com monossacarídeos. Sorbitol (barras pretas), D-manose (barras achuradas horizontais), D-fucose (barras brancas) e N-acetil glucosamina (barras achuradas transversais). Os valores sobre as barras referem-se aos percentuais de inibição da adesão do fungo à monocamada. As médias e desvio padrão são representativas de 3 repetições.

Os açúcares D-glicosamina e D-galactosamina, nas concentrações de 50 e 75 mM, induziram a morte das células da monocamada, entretanto nas concentrações de 5, 10 e 25 mM, as células mostraram viabilidade similar ao controle (dados não mostrados). Nas concentrações não letais, estes carboidratos diminuiram os eventos de adesão em relação ao controle, na ordem de 30% e 40% respectivamente (Figura 3).

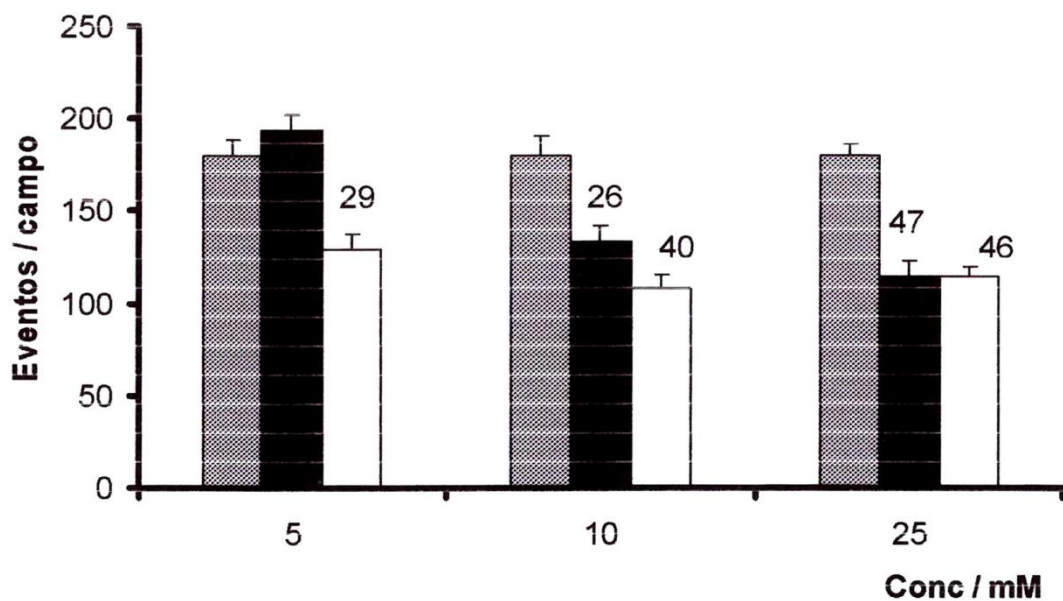


Figura 3. Número de eventos de adesão por campo microscópico de propágulos de *P. brasiliensis* à monocamada de células CCL-6 após o tratamento com os monossacarídeos D-galactosamina (■) e D-glicosamina (□). Os valores sobre as barras referem-se aos percentuais de inibição da adesão do fungo à monocamada. As médias e desvio padrão são representativas de 3 repetições.

MARCAÇÃO DE PROPÁGULOS DE *P. brasiliensis* COM LECTINAS FLUORESCENTES

O tratamento de propágulos de *P. brasiliensis* com as lectinas ConA e WGA conjugadas com FiTC, resultou na marcação fluorescente das células leveduriformes

(Figura 4). O tratamento posterior das células marcadas com as lectinas ConA e WGA respectivamente com os carboidratos D-Manose e N-acetil-glicosamina na concentração de 100 mM resultou na diminuição da fluorescência dos propágulos, indicando que a marcação observada era específica. O tratamento das células do *P. brasiliensis* com as lectinas PNA e SBA não melhorou a marcação fluorescente mesmo quando o nível de detecção de fluorescência foi maximizado pelo aumento do tempo de exposição da câmera digital. Uma discreta marcação em células CCL-6 foi evidenciada nos tratamentos realizados com ConA-FITC e WGA-FITC, indicando a presença dos haptenos também na célula hospedeiro.

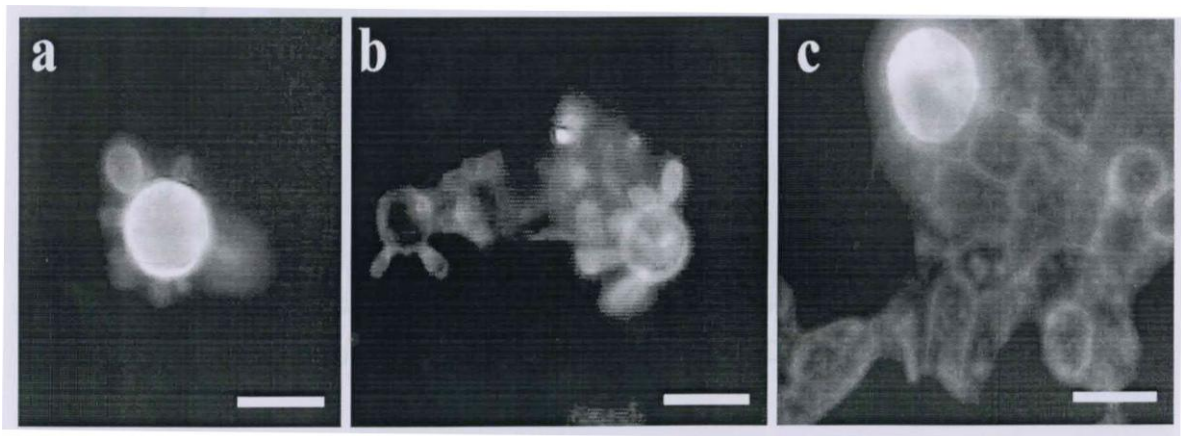


Figura 4. Células de *P. brasiliensis* após tratamento com lectinas fluorescentes: a) Células de *P. brasiliensis* corada por WGA conjugada com FITC. b) Células do fungo rotulada por ConA conjugada com FITC. c) Propágulo aderido a monocamada de células CCL-6 e corado por WGA conjugada com FITC. Barra = 10 μ m.

INIBIÇÃO DE ADESÃO DE *P. brasiliensis* A CÉLULA CCL-6 MEDIANTE USO DE PEPTÍDEOS

Células CCL-6 incubadas com os peptídeos GRGDSPK, GRGDTP e GRDGS não apresentaram nenhuma modificação morfológica detectável e mantiveram os mesmos níveis de viabilidade observados em células não tratadas, dado não

mostrado. Quando da adição de propágulos de *P. brasiliensis* em monocamadas tratadas com o peptídeo GRGDSPK, observou-se uma diminuição no número de propágulos aderidos na ordem de 72% (Figura 5). Na presença dos peptídeos GRGDTP e GRDGS os níveis de inibição observados foram da ordem de 62 e 30% respectivamente (Figura 5). O tratamento com uma solução de BSA 1mM não apresentou diminuição na quantidade de propágulos aderidos quando comparado ao controle (Figura 5).

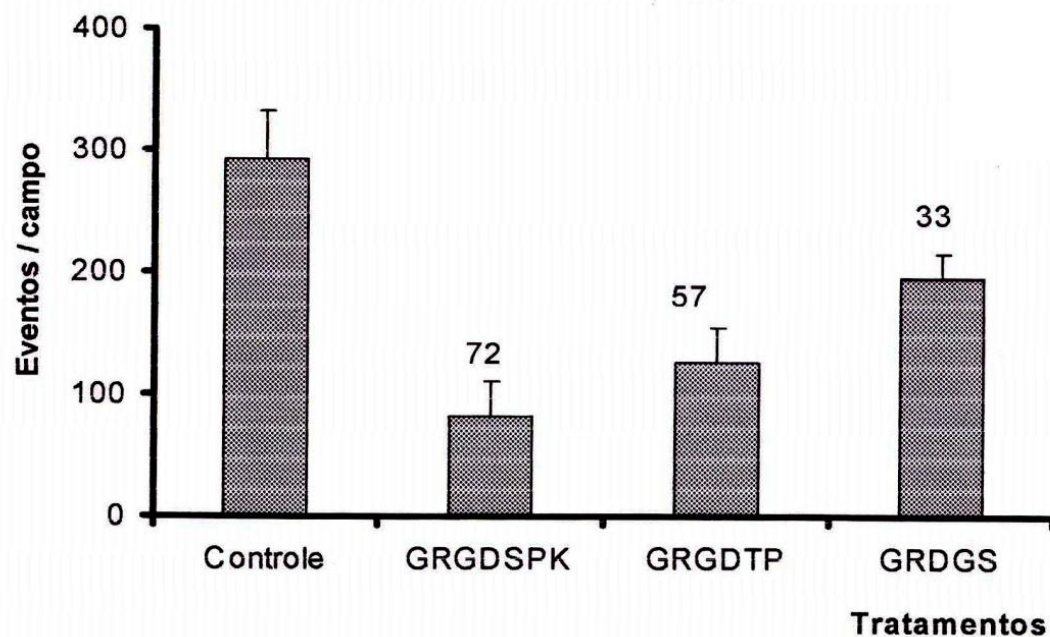


Figura 5: Número de eventos de adesão por campo microscópico de propágulos de *P. brasiliensis* a monocamada de células CCL-6 após tratamento com uma solução contendo 500 µg/mL dos peptídeos GRGDSPK, GRGDTP e GRDGS. Os valores sobre as barras referem-se aos percentuais de inibição de adesão do fungo. As médias e desvio padrão são indicativas de 3 repetições.

IMUNOLocalização DE RECEPTORES SEMELHANTES À INTEGRINA EM CÉLULAS LEVEDURIFORMES DE *P. brasiliensis*

Com o objetivo de evidenciar a existência de moléculas semelhantes à integrina na matriz extracelular do *P. brasiliensis*, anticorpos monoclonais anti-integrina CD18 (WT e 6.5E) e os anticorpos policlonais anti- β_2 e β_1 foram utilizadas em um protocolo de imunocitoquímica. O anticorpo anti-CD18 não reconheceu nenhuma estrutura nas células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Entretanto, após o tratamento com os anticorpos $\alpha_{11}\beta_1$ e β_2 , observou-se a marcação da célula fúngica (Figura 6). Fluorescência foi observada na célula mãe do *P. brasiliensis* enquanto os brotos do propágulo não se mostraram fluorescentes. Os dois anticorpos marcaram a célula-mãe em regiões determinadas, não sendo observada uma fluorescência generalizada em toda a célula, indicativo do acúmulo do hapteno em regiões específicas.

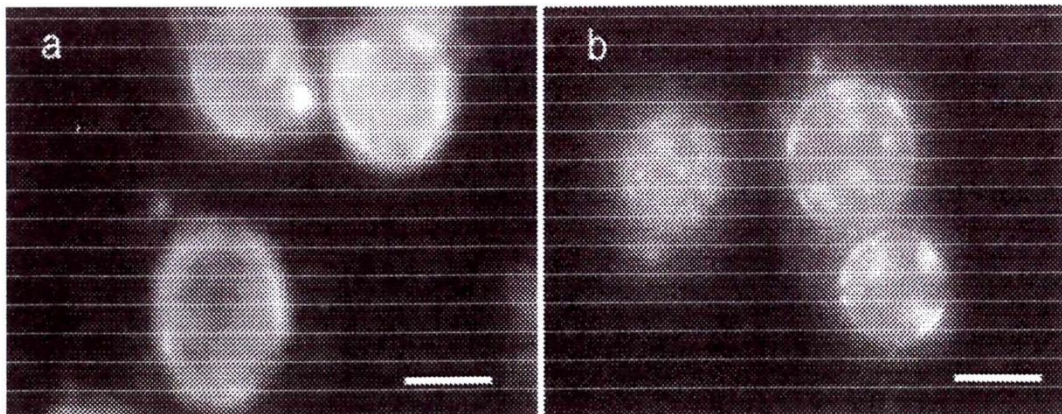


Figura 6: Células leveduriformes de *P. brasiliensis* com pré-tratamento com anticorpos primários anti- $\alpha_{11}\beta_1$ (a) e β_2 (b), e pós-tratamento com anticorpo secundário conjugado com FITC. Barra = 10 μ m.

INIBIÇÃO DE ADERÊNCIA DE *P. brasiliensis* EM CÉLULAS CCL-6 MEDIADA POR ANTICORPOS ANTI-gp43 E ANTI-PB-TOTAL

A glicoproteína gp43 é reconhecida como uma importante mediadora de aderência de *P. brasiliensis* a células epiteliais. Portanto, células leveduriformes do fungo foram tratadas com anticorpos monoclonal anti-gp43 e policlonal anti-Pb-total antes da interação com células CCL-6. Nas preparações tratadas com o anticorpo policlonal anti-Pb-total observou-se a diminuição do índice de adesão em 52% enquanto no tratamento com o anticorpo monoclonal anti-gp43 não se observou diminuição do índice de adesão (Figura 7). O anticorpo anti-gp43 foi eficiente no reconhecimento de leveduras de *P. brasiliensis*, o que foi evidente quando do tratamento com o anticorpo anti-Pb-total, como observado na Figura 1.

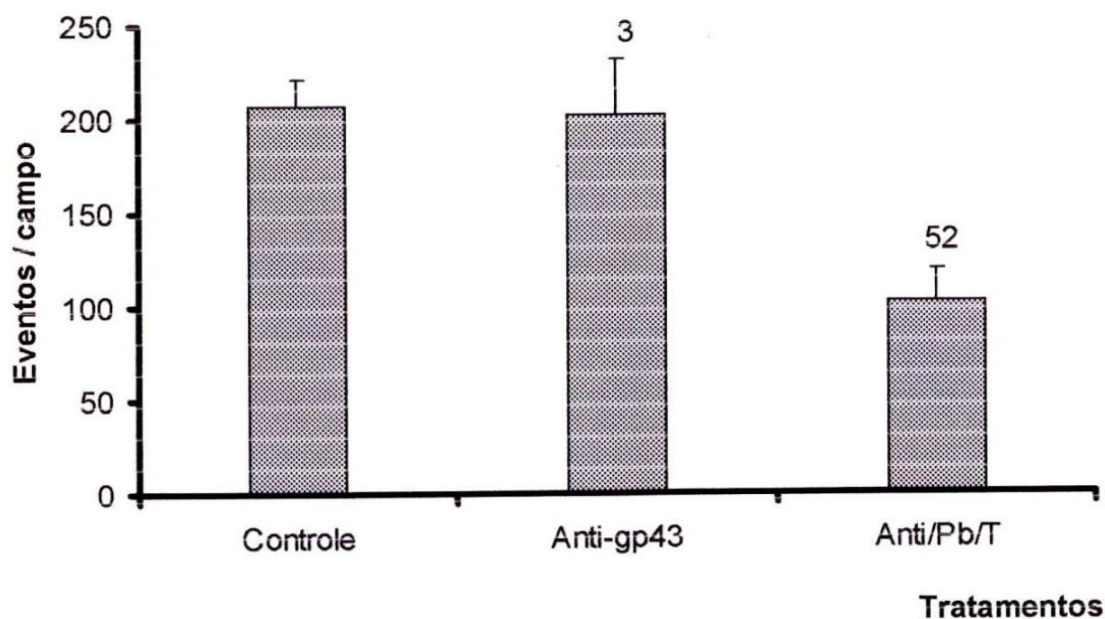


Figura 7. Número de eventos de adesão por campo microscópico de propágulos de *P. brasiliensis* à monocamada de células CCL-6 após tratamento com uma solução anticorpos anti-gp₄₃ (1/10) e anti-Pb-total (1/100). Os valores sobre as barras referem-se aos percentuais de inibição de adesão do fungo.

MOLÉCULA SECRETADA POR *P. brasiliensis* MODULA SUA ADESÃO EM CÉLULAS CCL-6

Dados de experimentos realizados previamente demonstraram que o número de células fúngicas viáveis em suspensão era superior ao de propágulo fúngicos aderidos a monocamadas de células Henle-407 (ATCC-CCL-6). Uma explicação para este fato seria a presença no meio de cultivo de um modulador de adesão endógeno. Para aferir esta possibilidade, o sobrenadante de culturas, de diferentes períodos de incubação do fungo foi utilizado como moduladores de adesão do *P. brasiliensis*.

Observou-se que, quando sobrenadantes de culturas com mais de 4 dias de idade foram adicionados a células jovens de *P. brasiliensis* e estes preparados foram adicionados à monocamadas de células CCL-6, o número de eventos de adesão era significativamente menor do que nas preparações controle (Figura 8). Por outro lado, quando células de *P. brasiliensis* com mais de 4 dias foram transferidas para meio RPMI fresco e então incubadas em monocamadas da célula epitelial não se observou diminuição da adesão quando comparado ao controle (Figura 8).

Quando às monocamadas de células CCL-6, elas foram tratadas com o sobrenadante de culturas de células fúngicas de 4, 6 e 8 dias de cultivo também observou-se uma diminuição significativa no índice de adesão em comparação ao observado em células incubadas com sobrenadantes fresco (Figura 9). É interessante observar que, quando as células epiteliais (CCL-6) foram pré-tratadas por 2 h com o sobrenadante de culturas de 4, 6 e 8 h e inoculadas com células jovens de *P. brasiliensis* suspensas em meio fresco, também observou-se diminuição significativa dos níveis de adesão (Figura 9).

Como muitos moduladores de adesão têm natureza protéica e proteínas sabidamente apresentam o fenômeno de ligação inespecífica, realizou-se um ensaio para aferir a possibilidade do evento de inibição de adesão estar sendo influenciado pelo soro fetal bovino e outras proteínas presentes no meio de cultura de *P. brasiliensis*. Neste sentido, o sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis* de 7 dias, foi diluído 1/2 em meio RPMI com SFB e células jovens de *P. brasiliensis* foram adicionadas às células hospedeiras. Observou-se que o número de eventos de

adesão não variou estatisticamente para sobrenadantes obtidos de culturas do fungo com e sem SFB (Figura 10). Uma observação interessante foi que o sobrenadante de 7 dias com SFB autoclavado apresentou um índice de redução de adesão do *P. brasiliensis* ainda maior foi observado (Figura 10).

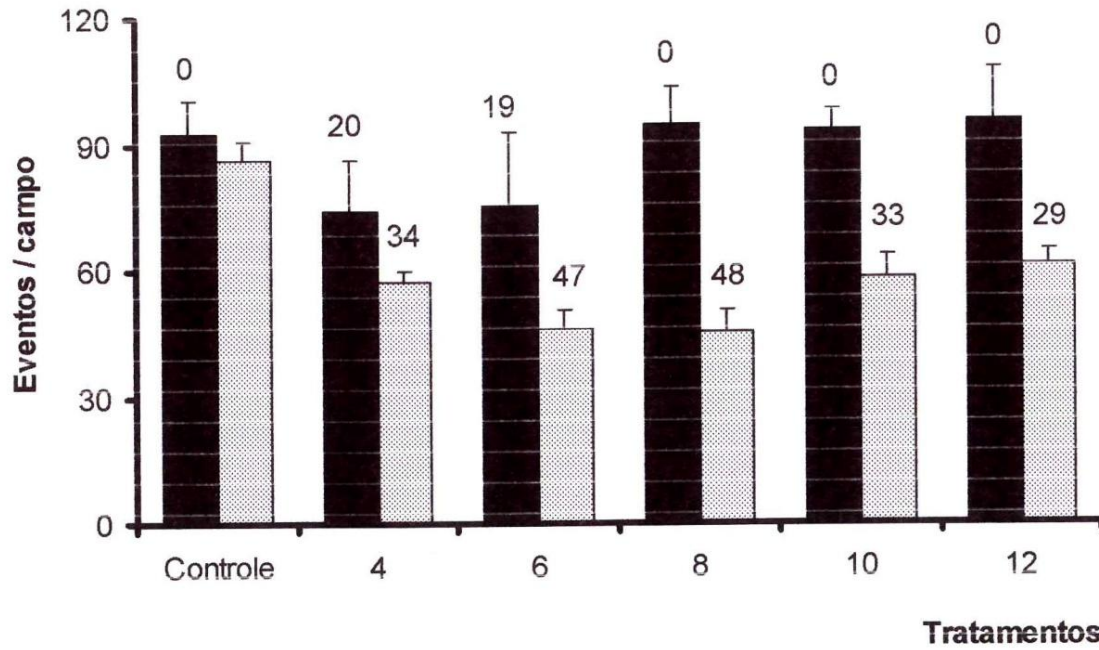


Figura 8: Número de eventos de adesão de propágulos de *P. brasiliensis* à monocamada de células CCL-6. As colunas pretas representam células fúngicas com 4, 6, 8, 10 e 12 dias de cultivo diluídos em meio RPMI fresco e transferidas para monocamadas de células CCL-6. As barras cinzas representam células de *P. brasiliensis* com 7 dias de idade ressuspensas em meio de cultura RPMI obtido da cultura do fungo de 4, 6, 8, 10 e 12 dias. Os valores sobre as barras indicam os percentuais de inibição de adesão do fungo. As médias e os desvios padrão são o resultado de 3 repetições.

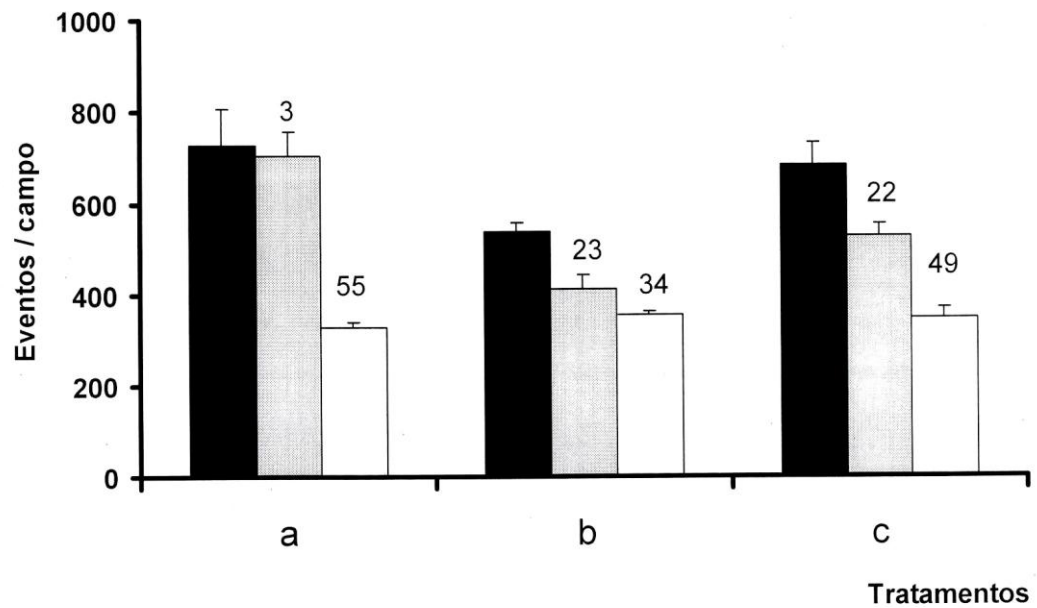


Figura 9: Número de eventos de adesão por campo microscópico de propágulos de *P. brasiliensis* a monocamada de células CCL-6. As colunas claras representam o nível de adesão de células de *P. brasiliensis* com 4, 6 e 8 dias de cultivo resuspenso em meio RPMI fresco e transferidos para monocamadas de células CCL-6. As colunas cinza representam a adesão de células de *P. brasiliensis* com 4, 6 e 8 dias de cultivo em meio RPMI com a mesma idade transferidos para células epiteliais. As colunas escuras representam a adesão de *P. brasiliensis* à células CCL-6 pré-tratadas por 2 h com sobrenadante de cultura fungica com 4, 6 e 8 h. As medias e desvio padrão são representativos de 3 repetições. Os valores sobre as barras referem-se aos percentuais de inibição de adesão do fungo.

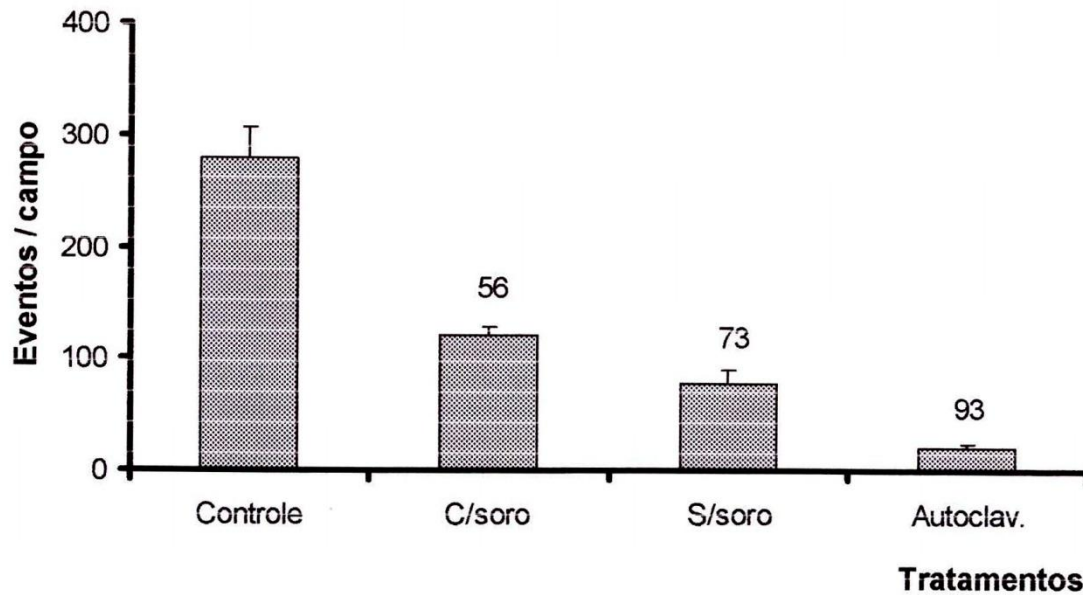


Figura 10: Número de eventos de adesão por campo microscópico de propágulos de *P. brasiliensis* à monocamada de células CCL-6 após tratamento com sobrenadantes de cultura de 7 dias de idade com e sem a adição de soro fetal bovino ou após o tratamento térmico por autoclavação. Os números sobre as barras indicam os percentuais de inibição de adesão do fungo relativos a três repetições.

EFEITO DAS FRAÇÕES DE SOBRENADANTE DE CULTURA DE *P. brasiliensis* NA MODULÇÃO DE ADESÃO

Para averiguar a natureza do suposto fator de adesão excretado pelo fungo em cultura, procedeu-se ao fracionamento do sobrenadante por precipitação em sulfato de amônio. As frações protéicas e não protéicas obtidas foram testadas quanto as suas capacidades de modificar o perfil de adesão do fungo a células hospedeiras em cultura, utilizando a metodologia anteriormente descrita. Não foi observado diferença no índice de adesão nas preparações pré-tratadas com a fração protéica quando comparadas com o controle não tratado (Figura 11). Por outro lado, o pré-tratamento das monocamadas com a fração não protéica do sobrenadante diminuiu significativamente a adesão do fungo à monocamada (Figura 11).

Visando purificar o presuntivo modulador de adesão, a fração não protéica do sobrenadante de 7 dias foi aplicado à uma coluna de Sepharose conjugada com Con-A. Esta coluna foi eluída com uma solução isocrática de Manopiranosídeo a 100 mM. As frações obtidas foram dializadas, concentradas para um mesmo volume, diluídas e testadas como moduladores de adesão. Dentre as várias frações obtidas a fração 4 reteve a capacidade de inibir a adesão do fungo à monocamada (Figura 12).

A fração F-4 foi cromatografada em TLC e revelada como os reagentes de Dragendorf e Jones. Observou-se a formação de uma mancha Dragendorf positiva (Figura 13). Esta mancha foi eluída, diluída e utilizada para testes de inibição de adesão. Observou-se a diminuição da adesão de *P. brasiliensis* à células CCL-6 em níveis similares ao sobrenadante de 7 dias não fracionado.

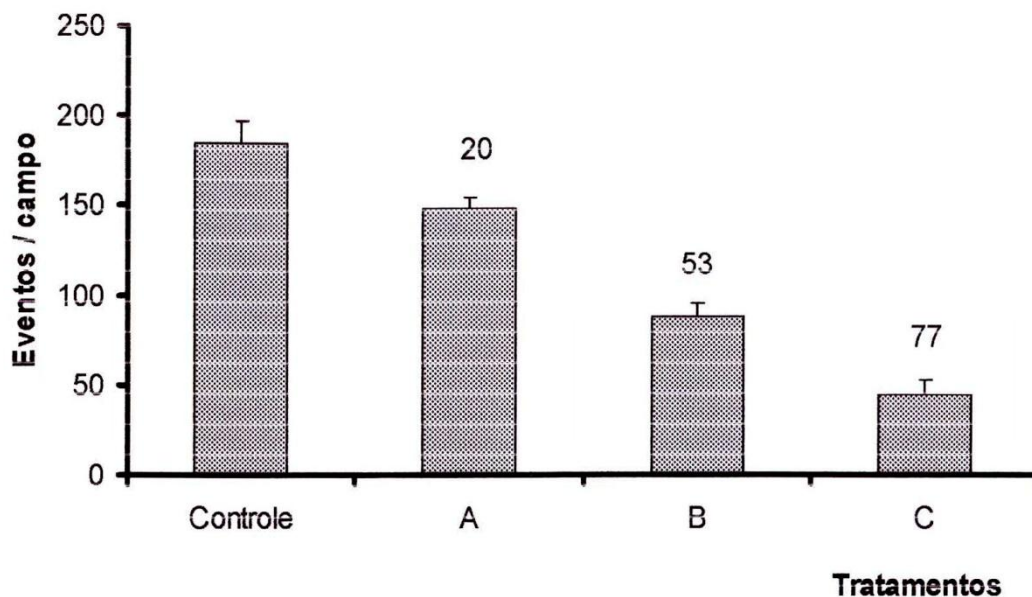


Figura 11: Número de eventos de adesão de propágulos de *P. brasiliensis* à monocamada de células CCL-6 por 50 campos microscópicos aleatórios. A) monocamada pré-tratada com protéica do sobrenadante de 7 dias. B) Tratamento com sobrenadante total. C) Fração não protéica do sobrenadante. Os valores acima das barras indicam os percentuais de inibição de adesão do fungo em relação ao controle não tratado.

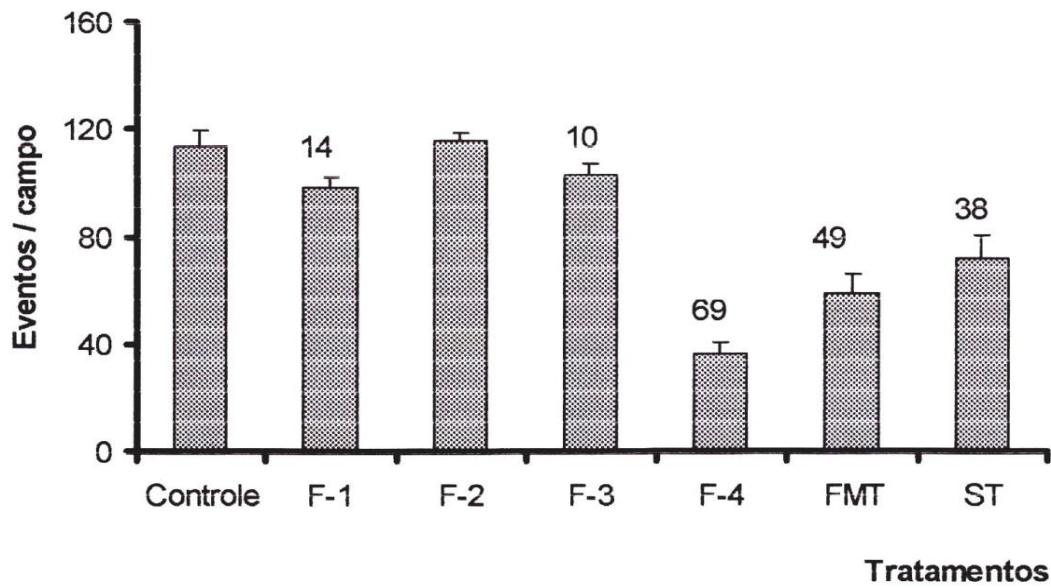


Figura 12: Número de eventos de adesão por campo microscópico de propágulos de *P. brasiliensis* à monocamada de células CCL-6 após tratamento com os eluatos da coluna de Sepharose-ConA (F1-F4), o fator modulador não purificado (FMT) e o sobrenadante total de cultura (ST), Os valores acima das barras referem-se aos percentuais de inibição de adesão do fungo.

A natureza da estrutura química da molécula moduladora de adesão está sendo caracterizada. Inicialmente utilizou-se a fração do sobrenadante que contém tal molécula para análise de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear e Infra-vermelho e os resultados preliminares estão ilustrados na (Figura 13, 14, 15 e 16). Até o momento não foi possível a caracterização química definitiva e pureza desse modulador de adesão, produzido pelo *P. brasiliensis*.

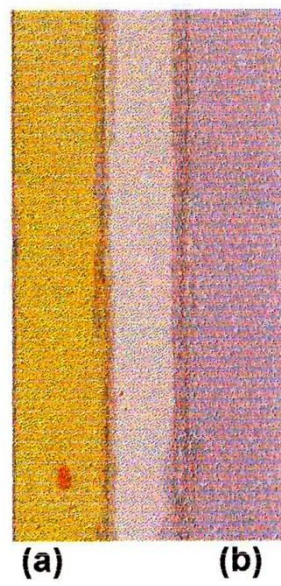


Figura 13: Perfil cromatográfico da fração livre de proteínas do sobrenadante de *P. brasiliensis* em placa de sílica gel. Coluna A, após tratamento com o reativo de Dragendorff (A) e Jones (B).

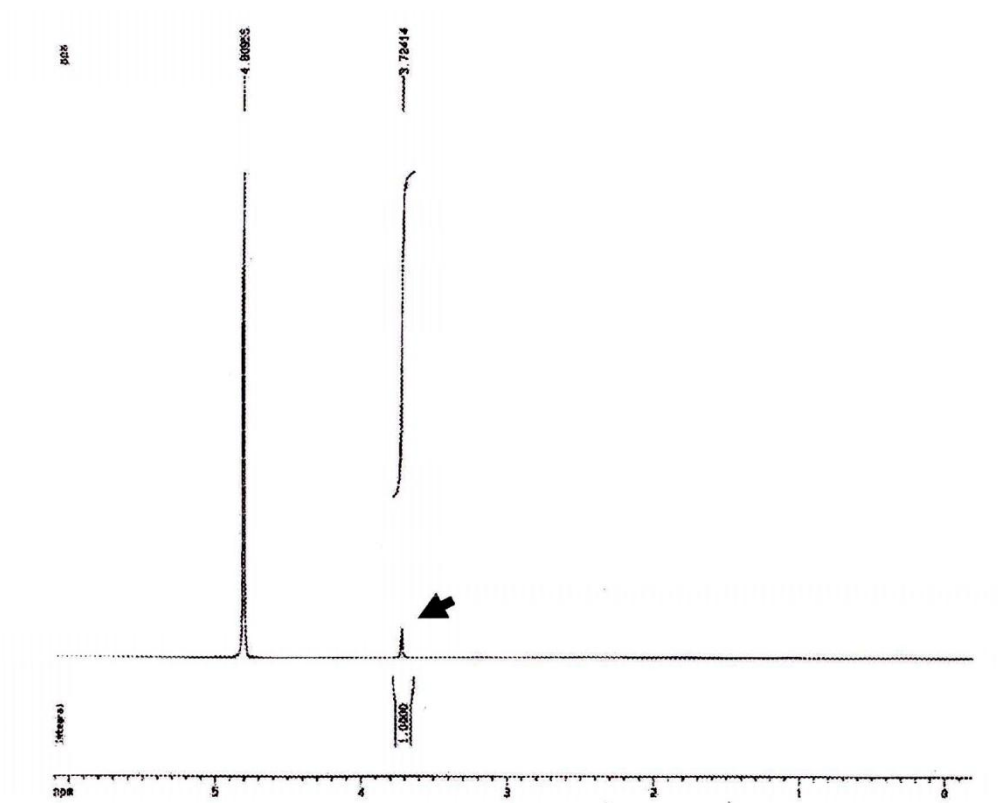


Figura 14: Espectro da ressonância magnética nuclear de fração livre de proteínas do sobrenadante de *P. brasiliensis*. A seta aponta para o pico característico para hidrogênio.

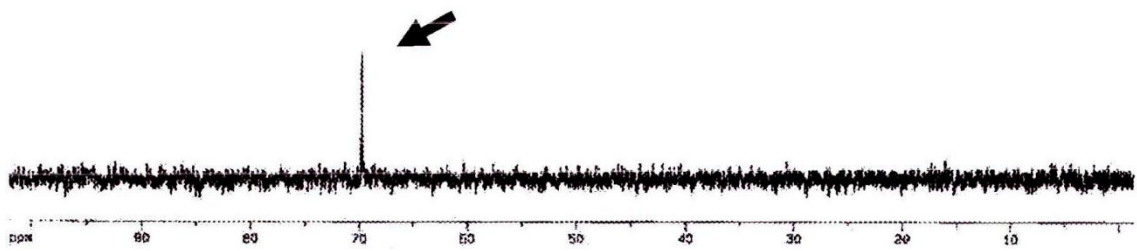


Figura 15: Espectro da ressonância magnética nuclear da fração livre de proteínas do sobrenadante de *P. brasiliensis* com o pico característico para carbono (seta).

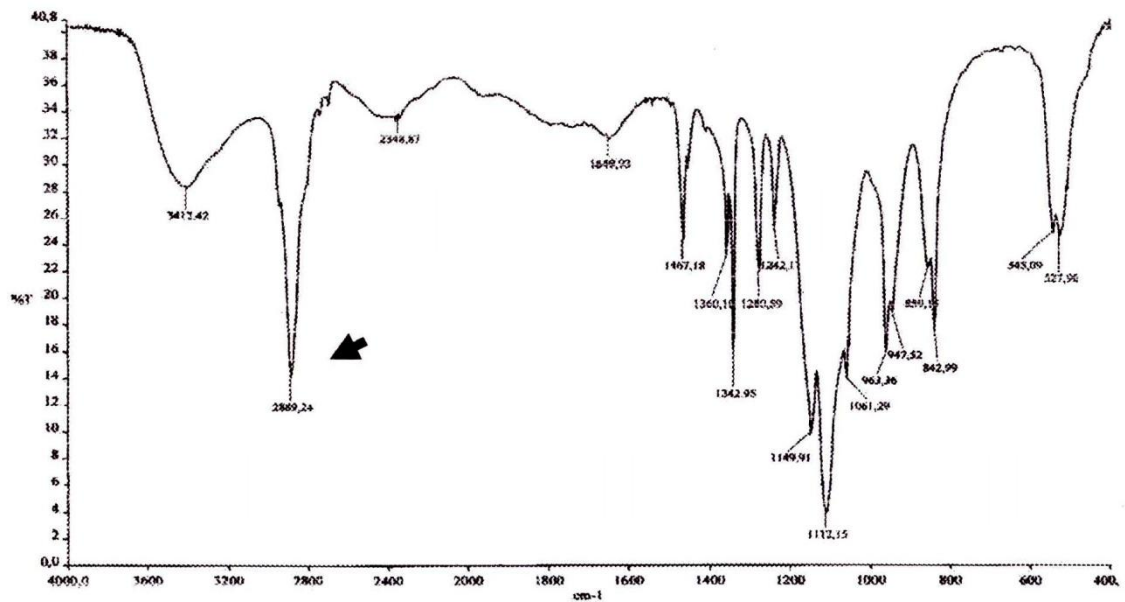


Figura 16: Espectro de infravermelho, fração livre de proteínas do sobrenadante de *P. brasiliensis*. A seta aponta para um suposto sinal para um grupamento amina presente na molécula.

DISCUSSÃO

O presente trabalho teve com objetivo o estudo de mediadores moleculares de adesão envolvidos na interação do *P. brasiliensis* e células CCL-6. Nesse estudo foi utilizado um modelo de infecção desenvolvido em nosso laboratório envolvendo *P. brasiliensis* e células CCL-6 (Silva, Cisalpino e Correa, 2001). Para aferir a capacidade de carboidratos em inibir a adesão do fungo em células CCL-6, os monossacarídeos: D-manose, D-fucose, D-galactose, D-glicosamina, N-acetil-glicosamina e Sorbitol foram adicionados ao meio de interação e o número de eventos de adesão por campo microscópico avaliado. Além dos carboidratos, os peptídeos, GRDSPK, GRGDTP e GRDG, relacionados à haptenos para integrinas também foram utilizados nas abordagens experimentais. Como auxiliar nestes experimentos anticorpos anti-intergrina (CD18 (WT e 6.5E), $\alpha_{11}\beta_1$ e β_2) e as lectinas ConA, WGA, PNA e SBA foram utilizados como marcadores da presença de receptores do tipo integrina e carboidrato respectivamente.

A habilidade de anticorpos anti-gp₄₃ e anti-*P. brasiliensis*-total em modificar o perfil de adesão do patógeno às células hospedeiras também foi investigado. Em diversos modelos de interação patógeno *versus* hospedeiros, os patógenos dispõem de estratégias que permitem o controle dos níveis de infecção e conseqüentemente do dano gerado aos seus hospedeiros. Estas estratégias resultam em ganhos ecológicos permitindo além da multiplicação do patógeno, a perpetuação do hospedeiro e conseqüentemente diminuem a competição infra-específica. Para aferir se mecanismos deste tipo estão presentes em *P. brasiliensis*, o efeito do sobrenadante e suas sub-frações na adesão do fungo a células CCL-6 foi estudado.

Carboidratos estão envolvidos em eventos de adesão e reconhecimento celular em diversos modelos de infecção. Limongi *et al.*, (1997), demonstraram que a adição dos carboidratos manose e N-acetil-glicosamina, ao meio de interação e também o pré-tratamento de propágulos fúngicos de *Fonsecaea pedrosoi* diminui a adesão e invasão do fungo a células epiteliais de ovário de Hamster chinês (CHO) em cultura. Manose é um carboidrato comumente associado à adesão de microrganismos ao seu hospedeiro. A adesão de *Trichophyton mentagrophytes* a células epiteliais também é reduzida quando microconídias do fungo são tratados com manose. A sonda fluorescente ConA-FITC evidenciou a presença deste açúcar em microconídias de *Trichophyton mentagrophytes* (Esquenazi *et al.*, 2003). Leveduras como *Candida albicans* e *C. glabrata* também tiveram sua adesão a substratos artificiais e células em cultura diminuídas após o tratamento com manose.

Células destas leveduras mutantes para a produção de monossacarídeo também tiveram a sua capacidade de adesão prejudicada (Cormack *et al.*, 1999).

Leishmanias também apresentam sua adesão a monócitos diminuída quando tratadas com manose (Santos *et al.*, 2001). As bactérias *Porphyromonas ginivialis* também deixam de aderir a células epiteliais quando incubadas na presença de manose (Agnani *et al.*, 2003). Aparentemente manose é um carboidrato importante e ubíquo em mecanismos de adesão de microrganismos ao seu substrato. *P. brasiliensis* também se comporta de maneira similar.

Uma inibição na adesão da ordem de 72% é observado quando células do fungo são incubadas em meio de cultura após a adição de 50 mM de manose. É interessante observar que, quando manose é adicionado ao meio de interação o evento de inibição de adesão é observado até 6 h pós-tratamento. Quando a interação se prolonga por 12 h após a inoculação o perfil de adesão do fungo às células CCL-6 se apresentam similar ao controle não tratado. Por outro lado, se nova adição do monossacarídeo é feita 8 h após a primeira, nova diminuição no número de eventos de adesão é observado (dados preliminares não mostrados). A maior parte dos experimentos de inibição de adesão por carboidratos se utiliza de carboidratos transformados e não metabolizáveis ou conjugados com substratos inertes e não absorvíveis (Limongi *et al.*, 1997; Forsyth *et al.*, (2002).

Nos nossos ensaios utilizou-se carboidratos em forma solúvel e metabolizável, o que explica a diminuição de seus efeitos após determinado período de incubação. Em outras palavras, o carboidrato é assimilado, metabolizado e sua concentração no meio diminui, conseqüentemente é observado a diminuição de seus efeitos. Quando nova administração do carboidrato é feito os níveis de adesão retornam para o anteriormente observado. Nas concentrações de manose utilizadas, não observou-se diminuição na viabilidade das células fúngicas e CCL-6, o que aponta para o fato de que a diminuição da adesão pelo açúcar é um evento fisiológico e não o resultado de um estado de incompetência das células.

N-acetil-glicosamina é outro açúcar frequentemente envolvido no mecanismo que regula a adesão de vários microrganismos e que foi capaz de inibir a adesão de células leveduriformes do *P. brasiliensis* ao hospedeiro. Este açúcar é componente da maior parte das paredes fúngicas e o seu papel em adesão é bem caracterizado. Singh *et al.*, (2001), demonstraram que mutantes para a via metabólica da síntese do N-acetil-glicosamina em *C. albicans* eram menos invasivos que as linhagens selvagens desse fungo, e sugeriram a participação desse carboidrato na mediação

de adesão. Novamente, os mediadores de adesão aparentemente são ubíquos. A bactéria *P. gingivalis* também aderiram significativamente menos a suas células hospedeiras quando do tratamento com N-acetil-glicosamina. Interessantemente, os níveis de diminuição de adesão para esta bactéria (81%) foi similar ao observado para *P. brasiliensis* na mesma concentração do inibidor Agnani *et al.*, (2003). Esses resultados são compatíveis com os obtidos em nosso trabalho, quando da utilização de carboidratos.

Outro componente comum em paredes fúngicas, a fucose, também foi capaz de diminuir a adesão de *P. brasiliensis* à monocamada de células hospedeiras. Receptores para fucose foram evidenciados por Vardar-Ünlü *et al.*, (1998) em tubos germinativos de *C. albicans* através de fucose na fucose marcada com FITC. A caracterização de receptores de fucose na superfície de *P. brasiliensis* em nosso estudo não foi estabelecido, entretanto, como este açúcar diminui significativamente e de maneira dose dependente a adesão do fungo a monocamadas de células CCL-6, existe a possibilidade da presença de receptores para esse sacarídeo em uma das duas células envolvidas na infecção.

D-galactosamina e D-glicosamina outros açúcares que adicionados ao meio de interação diminuíram a adesão de *P. brasiliensis* a células CCL-6. Esses monossacarídeos também foram implicados por outros autores como de importância nos mecanismos que regulam a interação de microrganismos e componentes da matriz extracelular de células hospedeiras (Yamada *et al.*, 2002). A participação de galactosamina mediando adesão de *Entamoeba histolítica* a células hospedeiras foi proposta por Espinosa-Cantellano *et al.*, (2002). O autor acredita que esta interação se dê via uma lectina e galactosamina expostos na superfície de células epiteliais. Além da sua importância no mecanismo de interação celular, D-galactosamina também tem papel importante na indução de apoptose celular (Morikawa *et al.*, 1996).

Apesar de apoptose não ter sido medida em nossos ensaios, observou-se diminuição na viabilidade celular quando D-galactosamina foi utilizada em concentrações em excesso de 50 mM. Em nossos experimentos utilizando concentrações menores de 25 mM, a morte celular não foi observada. Apesar de morbidade não ter sido observado nas concentrações utilizadas, não podemos descartar a hipótese de que estes carboidratos tenham efeito citotóxico e que este efeito também diminua a capacidade destas células em servir como sítio de ligação do patógeno. Em fungos D-glicosamina também inibe adesão. Forsyth *et al.*, (2002)

estabeleceram que a desão de leucócitos a hifas de *C. albicans* é prontamente inibida pela utilização de D-glicosamina.

Carboidratos têm sido implicados como importantes mediadores de adesão em diversos modelos biológicos. O tratamento celular com carboidratos ativamente diminui a eficiência de adesão do fungo aos tipos celulares hospedeiros. Analisando-se os resultados apresentados quando da utilização de carboidratos como competidores de inibição de adesão de *P. brasiliensis* em células CCL-6, pôde-se constatar a participação de açúcares nos mecanismos que regulam a interação do *P. brasiliensis* a células epiteliais de mamíferos *in vitro*. Infelizmente, apesar do efeito inibitório ter sido observado, não é possível, a partir do resultado experimental, diretamente implicar estes carboidratos, no mecanismo fisiológico de adesão.

Além dos açúcares, várias outras moléculas podem também estar envolvidas no processo de adesão e não terem sido evidenciadas no nosso modelo experimental. Portanto, estudos posteriores são necessários para identificar e caracterizar moléculas com afinidade por carboidratos que estão presentes na superfície do fungo e/ou substrato. Várias proteínas com afinidade por carboidrato estão descritas e a maior parte delas é chamada genericamente como lectinas. Sendo lectinas encontradas desde esponjas até vertebrados superiores, sua presença também é esperada em *P. brasiliensis*.

O tratamento de células leveduriformes de *P. brasiliensis* com as lectinas ConA, WGA, PNA e SBA conjugadas com FITC, resultou em marcação conspícua e específica para as lectinas Con-A e WGA, que se ligam respectivamente aos α -açúcares em-Acetil-glicosamina. Os haptenos para estas lectinas foram eficientes inibidores de adesão nos ensaios anteriores e a sua presença em células do patógeno é uma importante evidência para a sua função fisiológica em adesão. Também abre a possibilidade de se usar estas lectinas para a purificação do atual ligante celular fúngica, um dos responsáveis pela adesão do patógeno no seu hospedeiro. Importante salientar que o tratamento das células fúngicas marcadas com lectinas fluorescentes com os seus haptenos específicos resultou em diminuição da fluorescência celular o que aponta para uma interação específica entre lectina e a célula fúngica.

Por outro lado, a não evidenciação de marcação em células do fungo por lectinas, nos tratamentos realizados com PNA e SBA, reconhecem, respectivamente N-acetil-glicosamina e galactose, não invalida a possibilidade da existência desses açúcares. Diferentes fatores podem ser responsáveis pela não marcação pelas

lectinas como: inacessibilidade do marcador aos resíduos da parede fúngica, reduzido número de ligantes ou os açúcares são depositados de novo durante o curso da adesão.

A interação de microrganismos com proteínas da matrix extracelular de seus hospedeiros é notória na literatura, dentre elas cabe citar as proteínas fibronectina, vitronectina, laminina e colágeno (Dziewanowska *et al.*, 2000; Wasylska *et al.*, 2000). Destas proteínas, normalmente pequenas sequências peptídicas como RGD e LDV, são reconhecidas e interagem com proteínas do grupo das integrinas (Hynes *et al.*, 1982; Hynes 1987; Grinnell 1978; Schwartz *et al.*, 1999).

Diversos grupos de patógenos parecem utilizar este tipo de interação para reconhecer e aderir aos tecidos do hospedeiro. *C. albicans*, apresentam proteínas similares à integrina e *Sacharomyces cerevisiae* transformado expressando sequências do gene putativo de integrina de *Candida* são capazes de aderir à matrix extracelular de epitélios (Hostetter, 1989). Monócitos ativados interagem com *Hisoplasma capsulatum* através de moléculas do tipo integrina para adesão e posterior ingestão do propágulo fúngico (Retallack *et al.*, 1999). Lima *et al.*, (2001), observaram que a aderência de *Sporothrix scheenckii* à fibronectina imobilizada em placa de microtitulação foi dependente da concentração da proteína utilizada. O fungo *Uromyces appendiculatus*, um patógeno biotrófico de *Phaseolus vulgaris* também parece possuir receptores similares à integrina que são importantes no processo de diferenciação celular de estruturas de infecção (Corrêa *et al.*, 1986). Além de fungos, bactérias como o *Staphylococcus spp* também se utilizam de estratégias similares para a adesão. A utilização de anticorpos monoclonais anti-fibronectina e anti-integrina- β_1 em monocamadas de células epiteliais, com reconhecida função excretora de fibronectina, reduziram de modo significativo a adesão e internalização de *Staphylococcus aureus* (Dziewanowska *et al.*, 2000). Assim para investigar a existência de um sistema de adesão via integrinas e sequências contendo o tripeptídeo RGD, propágulos de *P. brasiliensis* foram co-cultivados em monocamadas de células CCL-6 na presença das sequências peptídicas GRDSPK, GRGDTP e GRDGS.

Em nossos ensaios a efetividade destes peptídeos em inibir a adesão do *P. brasiliensis* ao tipo celular hospedeiro foi dose dependente. O peptídeo GRGDTP também diminuiu a adesão de *C. albicans* em células epiteliais (Chaffin *et al.*, 1998; Forsyth *et al.*, 2002). GRDSPK e GRGDTP, também inibiram a diferenciação de apressórios tigmiotrópicos em *U. appendiculatus* (Correa *et al.*, 1996).

Analisando-se os percentuais de inibição de adesão de *P. brasiliensis* a células CCL-6 em cultura, verificou-se que houve redução de adesão em todos os tratamentos realizados com os peptídeos GRDSPK, GRGDTP e GRDGS, sendo mais significativo no tratamento realizado com GRDSPK. O tratamento com o peptídeo GRDGS, normalmente um não ligante para a integrina, ocasionou também diminuição estatística, apesar de marginal, no índice de adesão. Tratamentos na presença de BSA, entretanto, não demonstraram que a adesão pudesse ser diminuída por interação protéica não específica, o que nos leva a crer que o efeito observado deva-se efetivamente à sequência utilizada. Novos ensaios, utilizando as sequências aparentadas, precisam ser feitos para elucidar esta incongruência.

Anticorpos anti-integrina marcaram propágulos de *P. brasiliensis* indicando a possibilidade de existência de proteínas similares à integrina neste fungo. A marcação se mostrou concentrada em porções da célula mãe do *P. brasiliensis*, o que é compatível com o observado em outros tipos celulares, aonde esta proteína sedistribui agrupada em regiões específicas das células (Clark *et al.*, 1995).

Westem blots utilizando anticorpos anti-integrina- $\alpha_{11}\beta_1$ revelaram uma proteína de 60 kDa imunologicamente similar a esta integrina humana. Interessantemente a análise de sequências gênicas de *P. brasiliensis* indica a presença de um gene codificando um análogo de uma integrina β_1 (Goldman, *et al.*, 2003). Entretanto, estudos mais conclusivos a esse respeito precisam ser feitos.

A glicoproteína gp₄₃ foi implicada por Vicentini *et al.*, (1994), como sendo um ligante para laminina, uma proteína de matrix-extracelular. Como integrinas são reconhecidamente ligantes para laminina, testamos a possibilidade de anticorpos anti-gp₄₃ inibir a adesão de *P. brasiliensis* a células CCL-6. Nenhuma inibição foi demonstrada. Como controle deste experimento um anticorpo policlonal anti-Pb-total foi também utilizado como modulador de adesão com sucesso. Este resultado, entretanto, não descarta a possibilidade de gp₄₃ ser também importante no evento de adesão do *P. brasiliensis*, pois devido a alta especificidade de anticorpos monoclonais para haptenos específicos podemos ter utilizado um anticorpo que, apesar de reconhecer a proteína não a reconhece em seu sítio ativo para adesão. Outra particularidade deste experimento que pode mascarar o real papel da gp₄₃ na adesão do fungo ao hospedeiro é o fato da grande quantidade de gp₄₃ solúvel que é excretada pelo patógeno (Stambuk *et al.*, 1988). Esta grande quantidade de proteína solúvel pode ter sequestrado o anticorpo e impedido que o mesmo inibisse a adesão

do fungo. Interessantemente, tentativas de imunolocalizar a proteína gp₄₃ no *P. brasiliensis* também não tiveram sucesso.

Mecanismos fisiológicos que levem a modulação da virulência de um patógeno são extremamente importantes para a sua manutenção. Sistemas hipervirulentos levam à diminuição da disponibilidade de hospedeiros e conseqüentemente, apesar de no primeiro momento causarem um aumento da propagação do patógeno, ocasionam ao longo do tempo a diminuição dos sítios de multiplicação do patógeno. A infecção em um mesmo sítio por muitos propágulos do patógeno também é deletério, pois aumentam o dano causado ao hospedeiro e portanto prejudicam a sobrevivência do patógeno, acredita-se assim, que ao longo da evolução, diversos sistemas de infecção selecionaram estratégias de auto-modulação de infecção. Para investigar a existência deste tipo de evento na modulação da adesão do *P. brasiliensis* a células epiteliais, aferimos o efeito de sobrenadante de culturas com idades diversas.

Foi observado que, de fato, o fungo secreta em cultura líquida, substâncias que reduzem, de modo significativo, sua adesão a células CCL-6. Assim, o sobrenadante de culturas de 7 dias, com ou sem SFB, em pré ou conseqüência tratamento, efetivamente reduziu a adesão de *P. brasiliensis* a células epiteliais CCL-6.

A natureza deste modulador permanece entretanto desconhecida. Para verificar se este modulador possuía natureza protéica, o sobrenadante de cultura de 7 dias foi subtido à autoclavação e o autoclavado utilizado para o tratamento de células de *P. brasiliensis* e CCL-6. Observou-se que o índice de inibição de adesão foi ainda menor do que o observado para o sobrenadante não tratado. Em ensaios de precipitação de proteínas com sulfato de amônio a fração protéica obtida não diminui os índices de adesão observados no controle. A fração não protéica entretanto, manteve a capacidade de reduzir a adesão. O fracionamento subseqüente da fração não protéica por cromatografia de afinidade com Com-A e TLC resultou em frações que ainda mantiveram a atividade inibitório. Estudos preliminares por ressonância magnética e infravermelho indicam que estas frações estão puras o suficiente para análise química minuscios. Esperamos no futuro determinar com precisão à estrutura química desta molécula.

Em sobrenadantes de cultura, não raro, encontramos subprodutos do metabolismo celular, material excretado pelos propágulos e material resultante da degradação de células mortas (Chaffin *et al.*, 1998). Deste material, agora solúvel no

sobrenadante, seguramente fazem parte componentes naturais das células e, dentre estes, é plausível afirmar que componentes relacionados à adesão celular serão encontrados. Um excesso destes componentes seguramente funcionará como um competidos para os componentes ativos fisiologicamente e como consequência uma diminuição em sua atividade será detectada.

Por outro lado, pode-se tratar de uma molécula ativamente secretada pela célula do fungo, e que possui atividade na modulação de adesão. Estas questões serão melhor abordadas quando a natureza da molécula for desvendada e experimentos para a caracterização de atividade puderem ser delineados.

Uma delas nos induz a suposição que se trata de uma molécula secretada em função do metabolismo no fungo frente a uma ou várias situações que até o presente momento não foram totalmente estabelecidas. O fato é que se trata de uma molécula com atividade biológica que inibe a adesão do *P. brasiliensis* a células epiteliais CCL-6 humana em cultura.

De nosso conhecimento não estão descritos nenhuma molécula com estas características sendo produzidas por fungos biotróficos patógenos de humanos.

CONCLUSÃO

- Tratamentos de células CCL-6 com os carboidratos, D-Manose, N-acetil-glicosamina, D-galactosamina e D-glicosamina diminuiram o número de células de *P. brasiliensis* aderidas a monocamadas dessas células.
- Lectinas fluorescentes demonstraram a presença de N-acetil-glicosamina, α -manose e/ou glicose na parede de *P. brasiliensis*.
- Proteínas imunologicamente relacionadas com integrinas do grupo $\alpha_{11}\beta_1$ e β_2 estão presentes em células leveduriformes de *P. brasiliensis*.
- Peptídeos contendo a sequência RGD inibem a adesão de *P. brasiliensis* a células CCL-6.
- Sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis* possui moléculas que inibem a adesão do fungo em células CCL-6.
- O inibidor de adesão presente no sobrenadante de cultura é de natureza não protéica e termo-estável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNANI, G.; TRICOT-DOLEUX, S., HOUALET, S., BONNAURE-MALLET, M. Epithelial cell surface sites involved in the polyvalent adherence of *Porphyromonas gingivalis*: a convincing role for neuraminic acid and glucuronic acid. *Infect. Immun*, v. 71, p. 991-996, 2003.
- ALBELDA, S. M.; BUCK, C. A. Integrins and other adher adhesion molecules. *Faseb*, v. 4, p. 2868-2880. 1990.
- ALBERTS, B.; BRAY, D., RAFF, J. L. M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. Molecular biology of the cell. Ed. Garland Publishing, Inc. *New York & London*. Ed. 2^a, 1989.
- ALEXANDER, S. S.; COLONNA, G., EDELHOCH, H. The structure and stability plasma cold-insoluble globulin. *J. Biol. Chem*, v. 254, p. 1501-1505, 1979.
- ALEXANDER, S. S.; COLONNA, G.; YAMADA, K. M., PASTAN, I., EDELHOCH, H. Molecular properties of a major cell surface protein from chick em bryo fibroblasts. *J. Biol. Chem*, v. 253, p. 5820-5824, 1978.
- ANDREWS, R. K. Molecular mechanism of platelet adhesion and activation. *J. Biochem Cell Biol*, v. 29(1), p. 91-105, 1999.
- ANGULO-ORTEGA, A.; POLLAK, L. Paracoccidioidoyicose; In R. D. Baker (Ed). The pathological anatomy of the micoses. Human infections with fungi, actinomycetes and algae. ISprineer Verlag, Berlin: p. 507-560, 1971.
- ARANGO, M.; YARZÁBAL, L. T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, v. 79, p. 115-124, 1982.
- ARISTIZABAL, B. H.; CLEMONS, K. V., STEVENS, D. A., RESTREPO, A. Influence of sex hormone on the transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells in normal or castrateal an hormone-reconstituted mice. In: VI ENCUENTRO INTERNACIONAL SOBRE PARACOCCIDIOIDOMICOSIS, Medellin, p. 36-44, 1996.

- ARISTIZABAL, B. H.; CLEMONS, K. V., STEVENS, D. A., RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: In vivo inhibition in females. *Infect. Immun*, v. 66, p. 5587-5591, 1998.
- AYAKO, S. R.; TANAKA, K., YOKOYAMA., FRANCO. M., BAGAGLI, E., MONTENEGRO, M. R., MIKAMI, Y., MIYAJI, M., NISHIMURA, K. Comparison between human and armadillo *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. *Mycopathologia*, v. 143, p. 165-169, 1999.
- BAGAGLI, E.; SANO, A., COELHO, K. I. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic área of paracoccidioidomycosis. *Amer. J. Trop. Med. Hyg*, v. 58, p. 502-512, 1998.
- BECK, K.; HUNTER, I., ENGEL, J. structure and function on laminin; anatomy of a multidomain glycoprotein. *Faseb J*. v. 4, p. 148-160, 1990.
- BIOGIONI, L.; SOUZA, M. J., CHAMA, L. G., MENDES, R. P., MARQUES, S. A., MOTTA, N.G.S., FRANCO, M. Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. *Transactions of the Royal Society of Topical Medicine and hygiene*, v. 78, p. 617-621, 1984.
- BLOTTA, M. H. S. L.; CAMARGO, Z. P. Immunological response to cell free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodifusion tests. . *Clin. Microbiol*, v. 26, p. 2147-2151, 1993.
- BORELLI, D. Prevalence of systemic mycoses in Latin America: In proc. Int. Symp. Mycoses. *Pan American Health Organization Washington, D. C. Publ. N° 205. P. 28-38, 1980.*
- BOSCARDIN, R. N.; BRANDÃO, H., BALLA, A. Bronchoalveolar lavage findigs in pulmonary paracoccidioidomycosis. *Sabourandia*, v. 23, p. 143-146, 1985.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRUMMER, E. Interaction of *Paracoccidioides brasiliensis* with host defense cells. In: FRANCO, M., LACAZ, C. S., RESTREPO, A. M., DEL NEGRO, G. (Ed). *Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, CRC Press*. P. 213-221, 1994.
- BRUMER, E.; CASTANEDA, E., RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: na update. *Clin. Microb. Rer*, apr. P. 89-113, 1993.
- BRUMMER, E.; HANSON, L. H., RESTREPO, A. & STEVENS, D. A. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: Killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect. Immun*, v. 57 (8). P. 2889-2294, 1989.
- CALICH, V. I. G.; PURCHIO, A., PAULA, C. R. A new fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathologia*, v. 66, p. 175-177, 1978.
- CASOTTO, M., PARIS, S., CAMARGO, Z. P. Antigens of diagnóstico value in three isolados of *Paracoccidioides brailiensis*. *J. Med. Vet. Mycol*, v. 29, p. 243-253, 1991.
- CHAFFIN, W. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L., CASANOVA, M., GOZALBO, D., MARTINEZ J. P. Cell wall and secreted proteins of *Candidas albicans*: Identification, function, and expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 62, pp. 130-180, 1998.
- CHUNG, A. E.; JAFFE, R., FREEMAN, I. L., VERGNES, J. P., BRAGINSKI, J. E., CARLINM, B. Properties of a basement membrane related glycoprotein sinthetized in culture by a mouse embryonal carcinoma-derived cell line. *Cell*, v. 16, p. K. 277-287, 1979.
- CLARK, E. A.; BRUGGE, J. S. Integrin and signal transduction pathways: the road taken. *Scien*, v. 268, p. 233-239, 1995.

- CORMACK, B. P.; GHORI, N., FALCOW, S. An adhesion of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Scien*, v. 285, p. 578-582, 1999.
- CORRÊA, A. J.; HOCH, H. C. Microinjection of urediospore germilings of *Uromyces appendiculatus*. *Experimental Mycology*, v. 17, p. 253-273, 1993.
- CORRÊA, A. J.; STAPLES, R. C., HOCH, H. C. Inhibition of thigmostimulated cell differentiation with RGD-peptides in *Uromyces* germilings. *Protoplasma*, v. 194. P. 91-102, 1996.
- DIAMOND, M. S.; SPRINGER, T. A. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr. Biol*, p. 4-506, 1994.
- DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrates-recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem*, v. 263, p. 9557-9560, 1988.
- DZIEWANOWSKA, K.; CARSON, A. R., PATTI, J. M.; DEOBALD, C. F., BAYLES, K. W.; BOHACH, G. A. *Staphylococcus* fibronectin binding proteracts with heat shock protein 60 and integrins: Role in internalization by epithelial cells. *Infect. Immun*, v. 68, p. 6321-6328, 2000.
- ENGEL. J.; ODERMATT, E., ENGEL, A., MADRI, J. A., FURTHMAYR, H., ROHDE, H., TIMPL, R. Shapes, domain organization and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix. *J. Mol. Biol*, v. 150, p. 97-120, 1981.
- ERICKSON, H. P.; CARRELL, N., MCDONAGH, J. Fibronectin molecule visualized in electrons microscopy: a long, thin, flexible strand. *J. Cell Biol*, v. 91, p. 673-678, 1981.
- ESPINOSA-CANTELLANO, M. & MARTINEZ-PALOMA, a. Pathogenesis of intestinal amebiasis: From molecules to disease. *Clin. Microbiol. Rer*, v. 13, p. 318-331, 2000.

- ESQUENAZI, D.; SOUZA, W., ALVINO, C. S., ROZENTAL, S. The role of surface carbohydrates on the interaction of microconidia of *Trichophyton mentagrophytes* with epithelial cells. *FEMS Immun. Med. Microbiol*, v. 35, p. 113-1123, 2003.
- FAVA NETO, C. Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz. *Rer. Inst. Adolfo Lutz* (São Paulo), v. 21, p. 99-194, 1961.
- FERREIRA, M. S.; FREITAS, L. H.; LACAZ, C. S. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dogfood probably contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. *J. Med. Vet. Mycol*, v. 28, p. 253-256, 1990.
- FORSYTH, C. B. & MATHEWS, H. L. Lymphocyte adhesion to *Candida albicans*. *Infect. Immu*, v. 70, p. 517-527, 2002.
- FRANCO, M. & MONTENEGRO, M. R. Anatomia patológica. In: DEL NEGRO; G.; LACAZ C. S. & FIORILLO A. M. (ed). Paracoccidioidomicose. São Paulo: Sarvier-Edusp. P. 99-117, 1982.
- FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol*, v. 25, p. 5-18, 1986.
- FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R., MENDES, R. P., MARQUES, S. A.; DILLON, N. L., MOTTA, N. G. S. Natural history of paracoccidioidomycosis: correlation with a recently proposed classification in its clinical forms. *Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.* São Paulo, 1987.
- GARCIA, N. M.; DEL NEGRO, G. M. B., HEINS-VACARRI, E. M. *Paracoccidioides brasiliensis*, nova amostra isolada de fezes de pingüim (*Pygocelis adeliar*). *Rer. Inst. Med. Trop.* São Paulo, v. 35, p. 227-235, 1993.
- GIRALDO, R.; RESTREPO, A., GUTIÉRREZ, F., ROBLEDO, M., LONDOÑO, F., HERNÁNDEZ, H., SIERRA, F., CALLE, G. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 45 patients. *Mycopathol*, v. 58, p. 63-70, 1976.

- GOIHMAN-YAHR, M.; ESSENFELD-YAHR, E., ALBORNOZ, M. C., YARZÁBAL, L., GIMENEZ, M. H., SAN-MARTIN, B., OCANTO, A., GIL, F., CONUIT, J. Defect of *in vitro* digestive ability of polymorphonuclear leukocytes in paracoccidioidomycosis. *Infec. Immun*, v. 28, p. 557-598, 1980.
- GOIHMAN-YAHR, M.; ESSENFELD-YAHR, E., ALBORNOZ, M. C., YARZÁBAL, L., DE GOMEZ, M. H., SAN MARTIN, B., OCANTO, A., GIL, F., CONVIT, J. Defect of *in vitro* digestive ability of polymorphonuclear leukocytes in paracoccidioidomycosis. *Infec. Immun*, v. 28, p. 557-566, 1990.
- GOLDAN, L. Z.; PICARD, M., SUEAR, A. M. Syntesis of heart-shock protein in mycelia and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Microbiol*, v. 40, p. 124-128, 1994.
- GOLDMAN, G. H.; MARQUES, E. R., RIBEIRO, D. C. D., BERNARDES, L. A. S., QUIAPIN, A. C., VITORELL, P. M., SAVOLDI, M., SEMIGHINI, C. P., OLIVEIRA, R. C., NUNES, L. R., TRAVASSOS, L. R., BATISTA, W. L., FERREIRA, L. E., MOREIRA, J. C., BOGOSSIAN, A. P., TEKAIA, F., NOBREGA, M. P., NOBREGA, F. G., GOLDMAN, M. H. S. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: Identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukary. Cell*, v. 2(1), p. 34-48, 2003.
- GRINNEL, F. cellular adhesiveness and extracellular substrata. *Int. Rev. Cytol*, v. 53, p. 65-114, 1978.
- HANNA, S. A.; JULIANA, L. M. S., MENDES-GIANNINI, M. J. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microb. Infec*, v. 2, p. 877-884, 2000.
- HEMLER, M. E.. VLA proteins in the integri family: structure, functions and their role on leukocytes. *Annu. Rev. Immunol*, v. 8, p. 365-400, 1990.

- HESS, S.; KANSE, S. M.; KOST, C. & PREISSNER, K. T. The versatility of adhesion receptor ligands in haemostasis: morpho-regulatory functions of vitronectin. *Thromb. Haemost*, v. 74, p. 258-265, 1995.
- HORWITZ, A.; DUGGAN, K., BUCK, C., BECKERLE, M. C., BURRIDGE., K. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin-a transmembrane linkage. *Natur*, v. 320, p. 531, 1986.
- HOSTELLER, M. K. RGD – mediated adhesion in fungal pathogens of humans, plants and insects. *C. Opin. Microbiol*, v. 3(4), p. 344-348, 2000.
- HOWLETT, J. A.; CHRISTODHER, A. Q. *Candida albicans* ultrastructure: colonization and invasion of oral epithelium. *Infec. Immun*, v. 29, p. 252-260, 1980.
- HUMPHRIES, M. J. & NEWHAM, P. The structure of cell-adhesion molecules. *Cell Biol*, v. 8, p. 78-83, 1998.
- HYNES, R. O; Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell*, v. 48. P. 549-554, 1987.
- HYNES, R. O.; YAMADA, K. M. Fibronectins: Multifunctional Modular Glycoproteins. *Jour. Cell Biol*, v. 95, p. 369-377, 1982.
- JIMENEZ, B. E.; MURPHY, J. W. In vitro effects of natural Killer cells against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase. *Infec. Immun*, v. 46, p. 552-558, 1984.
- JORGE, D. M.; Estudo ultraestrutural da infecção artificial de *Paracoccidioides brasiliensis* em células CCL-6 (Dissertação/Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, 2004.
- KENNEDY, M. J.; CALDERONE, R. A., CUTLER, J. E., KANABE, T., RIESSELMAN, M. H., ROBERT, R., SENET, J. M., ANNAIX, V., BOVALI, A., MIAHAZA, C., TRONCHIN, G., BOUCHARA, J. P., MIEGEUILLE, M., MAROT-LEBLOND, A.,

- SEGAL, E. Molecular basis of *Candida albicans* adhesion. *Med. Vet. Mycol*, v. 30, sup, 1, p. 95-122, 1992.
- KUROKAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F., PERAÇOLI, M. T. S. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. *Rev. Inst. Med. Trop*, São Paulo, v. 40(3), p. 125-135, 1998.
- LACAZ, C. S.; SAMPAIO, S. A. P. Tratamento da blastomicose sul-americana com anfotericina B. Resultados preliminares, *Ver. Paul*, v. 52, p. 443, 1958.
- LACAZ, C. S.; ZAMETH, V. A., DEL NEGRO, G., SIQUEIRA, A. M. Aspectos clínicos gerais. Formas polares da paracoccidiodomicose. Particularidades clínicas, infanto-juvenis. In: DEL NEGRO, G., LACAZ, C. S., FIIORILLO, A. M. (eds) *Paracoccidiodomicose*. São Paulo: *Sarvier-Edusp*, p. 141-147, 1982.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E. MARTINS, J. E. C. *Paracoccidiodomicose*; In: *Micologia Médica*. São Paulo, Brazil: *Sarvier*, p. 248, 1990.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E., MARTINS, J. E. C. *Paracoccidiodomicose*; In *Micologia Médica*. 8ª Ed. São Paulo Brasil: *Sarvier*, p. 248-261, 1991.
- LACAZ, C. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S., DEL NEGRO, G. B., SIQUEIRA, A. M. Mycological diagnosis and serodiagnostic. In: FRANCO, M., LACAZ, C. S., RESTREPO, A. M. DEL NEGRO, G. (Ed). *Paracoccidiodomycosis*. *Boca Raton, CRC Pres.*, p. 339-384, 1994.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E., MARTINS, J. E. C., HEINS-VACCARI, E. M., MELO, N. T. *Tratado de Micologia Médica*. Ed. *Sarvier*, São Paulo, p. 713, 2002.
- LEHNINGER, A. L. *Biochemistry. The molecular basis of cell structure and function*. Ed. *Worth Publishers, Inc*. New York, 1971.
- LIMA, O. C.; FIGUEIREDO, C. C., PREVIATO, J. O., MENDONÇA-PREVIATO, L., MORANDI, V., BEZERRA L. M. L. Involvement of fungal cell wall components

in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. *Infect. Immun*, v. 69, p. 6874-6880, 2001.

LIMONGI, C. L.; ROZENTAL, S., S., ALVIANO, C. S., DE SOUSA, W. The influence of surface carbohydrates on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with Chinese hamster ovary glycosylation mutant cells. *Mycopathol*, v. 138, p. 127-135, 1997.

LONDERO, A. J.; RAMOS, C. D., LOPES, J. O., BENEVENGA, J. P. "Reservarea" da paracoccidioidomicose no Rio Grande do Sul, Brasil. *Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 14, p. 377, 1972.

LYON, A. C. M.; Estudo comparativo do processo de infecção experimental de isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* obtidos de pacientes com diferentes formas clínicas da paracoccidioidomicose (Dissertação/microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, 2004.

MARTINS, R.; ALVES, M., FECCHIO, D., FRANCO, M. F. Serological follow-up of patients with paracoccidioidomycosis treated with Itraconazole using dot-blot, Elisa and Western-blot. São Paulo. *Rev. Inst. Med. Trop*, v. 39, p. 261-269, 1997.

MENDES, R. P.; NEGRONI, R., ARECHAVALA, A. Tratment and control of cure. In: FRANCO, M., LACAZ, C. S., RESTREPO, A. M., DEL NEGRO, G (Ed.). *Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, CRC Press*, p. 373-381, 1994.

MENDES, R. P.; NEGRONI, R., ARECHAVALA, A. Tratment and control of cure. In: FRANCO, M., LACAZ, C. S., RESTREPO, A. M., DEL NEGRO, G. (Ed.). *Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, CRC Press*, p. 374, 1994.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; RICCI, L. C., VEMURA, M., TOSCANO, E., ARNUS, C. W. Infection and apparent invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol*, v. 32, p. 189-195, 1994.

MEREDITH, J. J.; WINITZ, S., LEWIS, J. M., HESS, S., REN, X. D., RENSHAW, M. W., SCHWARTZ, M. A. The regulation of growth and intracellular signaling by integrins. *Endocr. Rev*, v. 17, p. 207-220, 1996.

- MONTENEGRO, M. R. G. Carta ao Editor: Formas clínicas da paracoccidioidomicose. São Paulo. *Ver. Inst. Med. Trop.* V. 28, p. 203-204, 1986.
- MORIKAWA, A.; SUGIYAMA, T.; KATO, Y., KOIDE, N., JIANG, G. Z., TAKAHASHI, K., TAMADA, Y., YOKOCHI, T. Apoptotic cell death in the response of D-glactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide as an experimental endotox shock model. *Infect. Immun*, v. 64, p. 734-738, 1996.
- MOURA-CAMPOS, M. C. R.; GESZTESI, J. L., VICENTINI, A. P., LOPES, J. D., CAMARGO, Z. P. Expression and isoforms of gp-43 in different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol*, v. 33, p. 223-227, 1995.
- NEGRRONI, A.; ROBLES, A. M., ARECHAVALA, A., TIRABOSCHI, I. N. resultados Del tratamiento com Itraconazol por via oral em la paracoccidioidomycosis. *Rer. Arg. Micología*, (supl), PP. 27-32, 1987.
- NEGRONI, R.; ROBLES, A. M., ARECHAVALA., TABORDA, A. Experiência terapêutica com el fluconazol en las micosis profund. *Rer. Arg. Micol.*, v. 13, p. 26-32, 1990.
- PASCUIM, S. M.; SOUSA, M.; SOUSA, M. J., FRANCO, M. F. Contribuição ao estudo da quimiotaxia em paracoccidioidomicose. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA, XVII, Ribeirão Preto. *Anais.* F7p, 1982.
- PERTERSON, S. W., SINGLER, L. Molecular genetic variation *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. *J. Clin. Microbiol*, v. 36, p. 2918-2925, 1998.
- PERYASSÚ, D. O sistema retículo-entotelial na blastomicose Sulamericana experimento do cobaio: Sua importância no tratamento sulfanilâmico. *J. Bras. Med*, v. 6, p. 503-515, 1962.

- PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R. The 43-kDa glycoprotein from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form excretion and susceptibility to proteolysis. *Arch. Bioch. Bioph*, p. 298-302, 1991.
- QUEIROZ-TELES, F.; COLOMBO, A. L., NUCCI, M. Programa de Educação Médica; Paracoccidioidomicose. São Paulo Brasil: JANSSEN-CILAG. *Soc. Bras. Infec*, 1980.
- RESTREPO, A.; VÉLEZ, H. Efectos de la fagocitosis in vitro sobre el *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabour*, v. 13, p. 10-21, 1975.
- RESTREPO, A.; STEVENS, D. A., GOMEZ, I., LEIDERMAN, E., ANGEL, R., FUENTES, J., ARANA, A., MEJIA, G., NANEGAS, A. C., ROBLEDO, M. A. Ketoconazole: a new drug for the tratament of paracoccidioidomycosis. *Rev. Infec. Dis*, v. 4, p. 633, 1980.
- RESTREPO, A. Imunidade humoral. In: DEL NEGRO, G., LACAZ, C. S., FIORILLO, A. M. (Ed). *Paracoccidioidomicose*. São Paulo. *Sarvier-Edusp*, p. 127-133, 1982.
- RESTREPO, A.; SALAZAR, M. E., CANO, L. E., STOVER, E. P., FELDMAN, D., STEVENS, D. A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infe. Immun*, v. 46, p. 346-353, 1984.
- RESTREPO, A.; TABARES, C. B. A. M. In vitro susceptibility of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form to antifungal agents. São Paulo. *Inst. Med. Trop*. P. 322, 1984.
- RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *J. Med. Vet. Mycol*, v. 22, p. 323-334, 1985.
- RESTREPO, A. Actualización sobre la paracoccidioidomycosis y su agente etiológico, 1986-1989. *Interc*, v. 15, p. 193-199, 1990.

- RESTREPO, A. Treatment of tropical mycoses. *J. Am. Acad. Dermatol*, v. 31, p. 91-92, 1994.
- RHODES, J. C. Virulence factor in fungal pathogens. *Microbiol. Sci*, v. 5, p. 252-254, 1988.
- SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. *Paracoccidioides brasiliensis*: Cell wall structure and virulence. A review. *Mycopathol*, v. 62(2), p. 77-86, 1977.
- SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G. Bioquímica y dimorfismo en *Paracoccidioides brasiliensis*. In: DEL NEGRO, G., LACAZ, C. S., FIORILLO, A. M. (Ed). *Paracoccidioidomycose*. São Paulo: Savier-Edusp. P. 35-58, 1982.
- SAN-BLAS, G. Cell wall of fungal human pathogen, its possible role in host-parasite relationship. A review, *Mycopatho*, v. 79, p. 159, 1982.
- SANTOS, I. K. M.; COSTA, C. H. N., KRIEGER, H., FEITOSA, M. F., ZURAKOWSKI, D., FARDIN, B., GOMES, R. B. B., WEINER, D. L., HARN, D. A., EZEKOWITZ, R. A. B., EPSTEIN, J. E. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral Leishmaniasis. *Infect. Immun*, v. 69, p. 5212-5215, 2001.
- SCALETSKI, I. C. A.; LOURDES, M. M. S., TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to Hela cells. *Infect. Immun*, v. 45, p. 534-536, 1984.
- SCHVARTZ, I.; SEGER, D., SHALTIEL, S. Vitronectin. *Int. J. Biochem. Cell Biol*, v. 31, p. 539-544, 1984.
- SEIFFERT, D. Constitutive and regulated expression of vitronectin. *Histol. Histopathol*, v. 12, p. 787-797, 1997.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; ASSIS, C. M.; TAKEDA, K. M.; TAMASHIRO, N. & BUENO, J. P. Monocyte adherence to *Paracoccidioides Brasiliensis*, zymosan-C₃b and erythrocyte-hemolysin in patients with paracoccidioidomycosis. *Mycopathol*, v. 138, p. 65-69, 1997.

- SIDRIM, J. J. C., MOREIRA, J. L. B. Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. Rio de Janeiro. *Guanabara/Koogan S.A*, p. 157-158. 1999.
- SILV, F. L. Estabelecimento *in vitro* de modelo para o estudo do processo infeccioso de *Paracoccidioides brasiliensis* em células hospedeiras de mamíferos (Dissertação/Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, 2001.
- SINGER-VERMES, L. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S., CALICH, V. L. G. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *J. Med. Vet. Mycol*, v. 27, p. 71-82, 1989.
- SINGH, P.; GHOSH, S., DATT A, A. Attenuation of virulence and changes in morphology in *Candida albicans* by disruption of the N-acetylglucosamine catabolic pathway. *Infect. Immun*, v. 69, p. 7898-7903, 2001.
- SMITH, J. W.; CHERESH, D. A. The Arg-Gly-Asp-binding domain of the vitronectin receptor. *J. Biol. Chem*, v. 263, p. 18726-18721, 1988.
- SPLENDRE, A. Un'affezione micotica con localizzazione nella mucosa della bocca. Osservada in Brasile. Determinate da funghi appartenentia alla tribú deali exoascei (*Zymonema brasiliensis* n.s.p). In: Volume in onore Del Prof. Angelo Calli nel 250 anno di inSeanamento. Roma: G. Bertero, 1912, p. 421-458 apud LACAZ, C. S.; PORTO, C. S., MARTINS, C. S. *et al.*, Tratado de Micologia Médica Lacaz. 9. Ed. SãoPaulo: *Sarvier*. Cap. 27. P. 639-729, 2002.
- STOVER, E. P.; SHAR, G., CLEMONS, K. V., STEVENS, D. A., FELDMOAN, D. Estradiol-binding proteins from mycelia and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect. Immun*, v. 51, p. 199-203, 1986.
- STRAUS, A. H., FREYMULLER, E., TRAVASSOS, L. R. & TAKAHASHI, H. K. Immunochemical and subcellular localization of the 43 kDa glycoprotein antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* with monoclonal antibodies. *J. Med. Vet. Mycol*, v. 34, p. 181-186, 1996.

- TIMPL, R. & DZIADEK, M. structure, development, and molecular pathology of basement membranes. *Int. Rev. Exp. Pathol*, v. 29, p. 1-112, 1986.
- VAN CUTSEN, J. M., THIENPONT, D. Miconazole, a broad-spectrum antimycotic agent with antibacterial activity. *Chemotherapy*, v. 17, p. 392, 1972.
- VARDAR-ÜNLÜ, G.; MCSHARRY, C., DOUGLAS, L. J. Fucose-specific adhesions on germ tubes of *Candida albicans*. *FEMS Immun. Med. Microb*, v. 20, p. 55-67, 1998.
- VICENTINI, A. P.; GESZTESI, J. L.; FRANCO, M. F., DE SOUSA, W., MORAES, J., TRAVASSOS, L. R., LOPES, J. D. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp-43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infec. Immun*, v. 62, p. 1465-1469, 1994.
- VICENTINI, A. P.; MORAES, J. Z., GESZTESI, J. L., FRANCO, M. F. O., DE SOUSA, W., LOPES, D. Laminin-binding epitope on GP-43 from *Paracoccidioides brasiliensis* is recognized by monoclonal antibody raised against *Staphylococcus aureus* laminin receptor. *J. Med. Vet. Mycol*, v. 35, p. 37-43, 1997.
- VILLAR, L. A.; SALAZAR, M. E., RESTREPO, A. Morphological study of a variant *Paracoccidioides brasiliensis* that exists in the yeast form at room temperature. *J. Med. Vet. Mycology*, v. 26, p. 269-276, 1988.
- WASYLNKA, J. A., MOORE, M. M. Adhesion of *Aspergillus* species to extracellular matrix proteins: evidence for involvement of negatively charged carbohydrates on the conidial surface. *Infect. Immun*, v. 68, p. 3377-3384, 2000.
- YAMADA, M.; NAKAE, H., YUMOTO, H., SHINOHARA, C., EBISU, S., MATSUO, T. N-acetyl-D-galactosamine specific lectin of *Erikenella corrodens* induces intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) production by human oral epithelial cells. *J. Med. Microbiol*, v. 51, p. 1080-1089, 2002.

YAMAMOTO, K.; Y. KONAMI, Y., OSAWA, T. Chimeric lectin of Bauhiniapufpufea lectin and Lens culinaris lectin recognizes unique carbohydrate structure. *J. Biochem*, v. 127, p. 129-135, 2000.

ZAMETH, V. A.; LACAZ, C. S., SIQUEIRA, A. M., SANTOS C. R., OLIVEIRA, Z. N. P. Paracoccidioidomicose forma hiperárgica com prováveis lesões de mícide (blastomide ou paracoccidioidomicose). Registro de um caso. *Anais Brasileirosde Dermatol*, v. 56, p. 273-278, 1981.

