

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA-UnB
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

PERFIL TRANSCRICIONAL DE *Paracoccidioides brasiliensis* EM
RESPOSTA À FAGOCITOSE POR MACRÓFAGOS MURINOS

Aldo Henrique Fonseca Pacheco Tavares

BRASÍLIA-DF
2007

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA-UnB
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

PERFIL TRANSCRICIONAL DE *Paracoccidioides brasiliensis* EM
RESPOSTA À FAGOCITOSE POR MACRÓFAGOS MURINOS

Aldo Henrique Fonseca Pacheco Tavares

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de Brasília,
como requisito parcial para obtenção do
título de Doutor em Patologia Molecular
(Imunologia aplicada)

Orientadora: Profa. Dra. Ildinete Silva-Pereira

BRASÍLIA-DF
2007

ÍNDICE

1. RESUMO E ABSTRACT	1
2. INTRODUÇÃO	3
2.1. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e a Paracoccidioidomicose: aspectos gerais	3
2.2. Fatores de virulência em fungos causadores de micoses sistêmicas	8
2.3. A imunobiologia da PCM e outras micoses sistêmicas	13
2.4. A interação fungo-macróforo e o parasitismo intracelular	21
2.5. O fungo <i>P. brasiliensis</i> na era da genômica funcional	33
3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	37
4. OBJETIVO	37
5. MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1. Isolado fúngico e condições de cultura	39
5.2. Isolamento e cultivo de macróforos murinos peritoneais	39
5.3. Infecção <i>ex vivo</i> de macróforos murinos com leveduras de <i>P. Brasiliensis</i>	39
5.4. Análise da cinética da internalização de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> por macróforos	40
5.5. Extração de RNA total de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> internalizadas	40
5.6. Microarranjos de cDNA	41
5.6.1. Construção dos microarranjos	41
5.6.2. Quantificação do DNA depositado nos microarranjos	42
5.6.3. Preparo da sonda complexa e hibridação com os microarranjos	43
5.6.4. Detecção e quantificação dos sinais de hibridação	44
5.6.5. Normalização dos dados	44
5.6.6. Detecção de genes diferencialmente expressos	45
5.6.7. Deposição dos dados do experimento de microarranjo em banco de dados público	46

5.7. Validação por RT-PCR em tempo real de genes diferencialmente expressos	47
5.8. Produção de ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por macrófagos murinos infectados por <i>P. brasiliensis</i>	49
5.9. Análise por Northern-blot da expressão gênica de <i>sod3</i> após tratamento <i>in vitro</i> de <i>P. brasiliensis</i> com H_2O_2 e menadiona	50
6. RESULTADOS	52
6.1. Cinética da internalização de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> por macrófagos murinos	52
6.2. Extração de RNA total de <i>P. brasiliensis</i> internalizado	52
6.3. Identificação de genes de <i>P. brasiliensis</i> cuja expressão foi modulada após internalização por macrófagos murinos	54
6.4. Validação dos dados do microarranjo	59
6.5. Produção de O_2^- e H_2O_2 por macrófagos murinos infectados por <i>P. brasiliensis</i>	62
6.6. Análise por Northern-blot dos níveis do transcrito de <i>sod3</i> após tratamento <i>in vitro</i> de <i>P. brasiliensis</i> com menadiona e H_2O_2	63
7. DISCUSSÃO	64
7.1. Genes relacionados ao metabolismo	64
7.2. Genes relacionados à construção da parede celular	68
7.3. Genes relacionados ao estresse oxidativo	70
7.4. Considerações finais e perspectivas	76
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
9. ANEXOS	107
ANEXO 1. Lista de todos os 1152 genes que constituíram o microarranjo	
ANEXO 2. Lista contendo os 152 genes diferencialmente expressos no <i>P. brasiliensis</i> internalizado	

Produção científica

Artigos completos publicados

ANEXO 3.

Tavares, A.H., S. S. Silva, A. Dantas, E. G. Campos, R. V. Andrade, A. Q. Maranhão, M. M. Brigido, D. G. Passos-Silva, A. L. Fachin, S. M. Teixeira, G. A. Passos, C. M. Soares, A. L. Bocca, M. J. Carvalho, I. Silva-Pereira, M. S. Felipe. 2007. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbes Infect.* 9:583-590.

ANEXO 4.

Tavares, A.H., S. S. Silva, V. V. Bernardes, A. Q. Maranhão, C. M. Kyaw, M. Pocas-Fonseca, I. Silva-Pereira. 2005. Virulence insights from the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet. Mol. Res.* 4:372-389.

ANEXO 5.

Felipe, M. S., R. V. Andrade, F. B. Arraes, A. M. Nicola, A. Q. Maranhão, F. A. Torres, I. Silva-Pereira, M. J. Poças-Fonseca, E. G. Campos, L. M. Moraes, P. A. Andrade, A. H. Tavares, S. S. Silva, C. M. Kyaw, D. P. Souza, M. Pereira, R. S. Jesuíno, E. V. Andrade, J. A. Parente, G. S. Oliveira, M. S. Barbosa, N. F. Martins, A. L. Fachin, R. S. Cardoso, G. A. Passos, N. F. Almeida, M. E. Walter, C. M. Soares, M. J. Carvalho, M. M. Brigido. PbGenome Network. 2005. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J. Biol. Chem.* 280:24706-24714.

Artigos completos submetidos

ANEXO 6.

Silva, S. S., A. H. Tavares, D. G. Passos-Silva, A. L. Fachin, S. M. Teixeira, G. A. Passos, C. M. Soares, A. L. Bocca, M. J. Carvalho, I. Silva-Pereira, M. S. Felipe. Transcriptional response of murine macrophages upon infection with *Paracoccidioides brasiliensis*- Submetido para *Microbes and Infection*.

ANEXO 7.

Derengowski, L. S., A. H. Tavares, S. S. Silva, L. S. Procópio, M. S. Felipe, I. Silva-Pereira. Upregulation of glyoxylate cycle genes upon *Paracoccidioides brasiliensis* internalization by murine macrophages and *in vitro* nutritional stress condition- Submetido para *Medical Mycology*.

ANEXO 8.

Fernandes, L., H. C. Paes, A. H. Tavares, S. S. Silva, A. Dantas, C. M. A. Soares, F. A. Torres, M. S. Felipe. Transcriptional profile of *ras1* and *ras2* and the potential role of farnesylation in the dimorphism of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*-
Submetido para FEMS Yeast Research.

ANEXO 9.

Resumos em congressos

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis, um fungo termo-dimórfico, é o agente etiológico da mais prevalente micose sistêmica da América Latina, a paracoccidioidomicose. A forma de levedura de *P. brasiliensis* atua como um patógeno intracelular facultativo, sendo capaz de sobreviver e replicar no interior de macrófagos e neutrófilos não ativados. Essa habilidade tem sido considerada crucial para o desenvolvimento da doença. Dessa maneira, o *P. brasiliensis* deve ter desenvolvido mecanismos que o permitiu adaptar-se ao ambiente hostil imposto por células fagocíticas. A fim de testarmos essa hipótese avaliamos a resposta transcricional de *P. brasiliensis* ao microambiente de macrófagos peritoneais murinos por meio da utilização da metodologia de microarranjo. Dos 1152 genes analisados, identificamos 152 genes que foram diferencialmente expressos no interior dos macrófagos. Esses genes estavam relacionados principalmente a limitação de glicose e aminoácidos, construção de parede celular e estresse oxidativo. Em geral, nossos resultados sugerem uma plasticidade transcricional de *P. brasiliensis* em resposta ao ambiente hostil dos macrófagos, o que auxiliaria a adaptação e conseqüente sobrevivência desse patógeno no hospedeiro.

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis, a thermal dimorphic fungus, is the etiologic agent of the most common systemic mycosis in Latin America, paracoccidioidomycosis. The yeast form of *P. brasiliensis* acts as a facultative intracellular pathogen being able to survive and replicate within the phagosome of nonactivated murine and human macrophages. This ability has been proposed to be crucial to the development of disease. Thus, *P. brasiliensis* may have evolved mechanisms that counteract the constraints imposed by phagocytic cells. By using cDNA microarray technology we evaluated the early transcriptional response of this fungus to the environment of peritoneal murine macrophages in order to shed light on the mechanisms used by *P. brasiliensis* to survive within phagocytic cells. Of the 1152 genes analyzed, we identified 152 genes that were differentially transcribed. Intracellularly expressed genes were primarily associated with glucose and amino acid limitation, cell wall construction, and oxidative stress. For the first time, a comprehensive gene expression tool is used for the expression analysis of *P. brasiliensis* genes when interacting with macrophages. Overall, our data show a transcriptional plasticity of *P. brasiliensis* in response to the harsh environment of macrophages which may lead to adaptation and consequent survival of this pathogen.

2. INTRODUÇÃO

2.1. *Paracoccidioides brasiliensis* e a Paracoccidioidomicose: aspectos gerais

As micoses sistêmicas impõem um problema sério e crescente de saúde pública, sendo uma importante causa de mortalidade e morbidade em todo o mundo. Apesar dos estudos sobre os fungos responsáveis por essas micoses terem aumentado consideravelmente, sobretudo devido às infecções oportunistas que acometem pacientes imunodeprimidos, estes focam principalmente naqueles fungos presentes em nível mundial. Por outro lado, fungos endêmicos como o *Paracoccidioides brasiliensis* tem recebido muito menos atenção.

O fungo dimórfico *P. brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), a mais prevalente micose sistêmica da América Latina. Lutz (1908) e Splendore (1912) foram os primeiros a relatar essa micose e observar o dimorfismo térmico desse fungo, respectivamente. *In vitro* a 37°C e em tecidos infectados, o *P. brasiliensis* cresce na forma de levedura caracterizada por sua forma oval ou esférica com diâmetro variando de poucos nanômetros em células jovens até 15-30 µm em leveduras maduras. Essas células são multinucleadas e multiplicam-se por brotamentos laterais o que resulta em uma estrutura com a aparência de roda de leme, a qual é a principal característica taxonômica e de diagnóstico desse fungo. A forma de micélio cresce lentamente à temperatura ambiente e é caracterizada por sua estrutura tubular de talo filamentosos (hifa) septado com comprimento de 1-3 µm (Carbonell, 1969; Franco, 1993). Assim como observado para outros fungos patogênicos, em *P. brasiliensis* a parede celular é a principal estrutura afetada pelo dimorfismo. A parede celular desse fungo é composta de lipídios, proteínas e polissacarídeos. A sua composição varia de acordo com a fase morfológica do fungo. Os polissacarídeos são responsáveis por 80% do peso seco da parede do fungo, sendo a quitina e os polímeros de glicose α -1,3-D-glicana e β -1,3-D-glicana os mais importantes (Kanetsuna *et al.*, 1970; San Blas *et al.*, 1987). Na fase miceliana 100% dos polímeros de glicose são β -glicana. Por outro lado, na fase leveduriforme a α -glicana é o principal polímero de glicose presente, enquanto a β -glicana contribui com apenas 5% (Kanetsuna *et al.*, 1970). A composição de lipídeos de membrana celular também sofre mudanças durante o processo de dimorfismo em *P. brasiliensis*. A forma de levedura possui duas vezes mais lipídeos que a forma miceliana. O ácido linoléico e os lipídeos insaturados são encontrados em maior quantidade na forma

miceliana, enquanto na forma de levedura o lipídeo predominante é o ácido oléico (San Blas & San Blas, 1977). Essa diferença possivelmente está relacionada à manutenção da permeabilidade normal da membrana, quando submetida à temperatura de 37°C, necessária para a sobrevivência da forma de levedura sugerindo, assim, um provável envolvimento dos ácidos graxos no processo de transição e adaptação celular desse fungo (Hamdan *et al.*, 1993).

Na última década testemunhamos grandes avanços no conhecimento da organização genômica de *P. brasiliensis*. Porém, conclusões definitivas são aguardadas. Estudos empregando diferentes técnicas como a eletroforese de pulso alternado, microscopia de fluorescência confocal e citometria de fluxo demonstram em diferentes isolados uma natureza haplóide, diplóide ou mesmo aneuplóide. Além disso, quatro ou cinco cromossomos com o tamanho variando entre 2 e 10 Mb foram identificados e o tamanho do genoma foi estimado em 20-23 Mb, com um número total de genes variando entre 7.500 a 9.000 (Montoya *et al.*, 1997; 1999; Almeida *et al.*, 2007; Feitosa *et al.* 2003; Reinoso *et al.*, 2005). Essa grande variabilidade genética associada aos diferentes níveis de virulência de isolados em modelo experimental de infecção (Singer-Vermes, 1989) levaram à hipótese do *P. brasiliensis* não ser uma espécie única (clonal), como vêm sendo sugerido desde sua descrição (Almeida, 1930). De fato, Matute *et al.* (2006) analisando oito regiões de cinco genes codantes em 65 isolados de *P. brasiliensis* indicaram a presença de três espécies crípticas decorrentes de dois eventos independentes de especiação. Ademais, em pelo menos uma dessas espécies, a qual englobava 38 isolados, observou-se a presença de recombinação nas regiões gênicas analisadas, o que constitui uma forte evidência de uma possível reprodução sexuada neste fungo.

A classificação taxonômica e a nomenclatura dos fungos são classicamente fundamentadas na observação do fenótipo nos estágios de reprodução sexuada. Apesar das fortes evidências moleculares para a reprodução sexuada (Felipe *et al.*, 2005; Matute *et al.*, 2006), a forma teleomórfica de *P. brasiliensis* é desconhecida, o que complica a sua classificação taxonômica baseado somente no fenótipo. A utilização de técnicas moleculares, fundamentadas na comparação de seqüência do DNA que codifica para subunidade maior do RNA ribossômico (26S) vem tornando mais fidedigna a classificação taxonômica dos fungos e posiciona atualmente o *P. brasiliensis* no reino Fungi, filo Ascomycota, classe Plectomycetes, ordem Onygenales e família Onygenaceae, juntamente com o *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis* (Leclerc *et al.*, 1994; Guarro *et al.*, 1999; Bialek *et al.*, 2000).

Apesar de não estar totalmente esclarecido o habitat e o ciclo de vida de *P. brasiliensis* diversos estudos ecoepidemiológicos sugerem que esse fungo sobreviva na sua fase miceliana de forma saprófita em regiões com vegetação perturbada e solos úmidos, ricos em matéria orgânica e com pequenas alterações de temperatura (Restrepo *et al.*, 1985; 2001). Em condições adversas (limitação de umidade e nutrientes) o fungo produz propágulos da forma miceliana denominados de conídios, os quais podem infectar, via aerógena, o homem (Restrepo *et al.*, 2001). Acreditava-se que o homem era o único hospedeiro infectado pelo *P. brasiliensis* até o fungo ter sido isolado em órgãos de tatus de nove bandas ou tatu galinha (*Dasybus novemcinctus*). A distribuição geográfica desse vertebrado e da PCM sobrepe-se, o que levou à hipótese do tatu ser um importante reservatório natural do fungo, uma vez que não havia evidências clínicas da doença no animal infectado (Bagagli *et al.*, 1998). Entretanto, a lesão granulomatosa característica da PCM identificada posteriormente em diferentes órgãos do tatu, sugerem que esses animais também sejam um possível hospedeiro animal para o *P. brasiliensis* (Bagagli *et al.*, 2003; Restrepo *et al.*, 2001). Recentemente, Theodoro *et al.* (2005), por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*) identificaram o *P. brasiliensis* nas fezes e no solo de buracos do tatu galinha naturalmente infectados. Dessa maneira pode ser vislumbrado um possível papel do tatu galinha no ciclo natural de *P. brasiliensis* devido à sua habilidade de eliminar e/ou disseminar o fungo no ambiente. É interessante notar que algumas populações rurais da América Latina consomem o tatu galinha como alimento, e que o contato com esses animais pode ser um fator de risco para PCM (Cadavid & Restrepo, 1993), justificando campanhas de saúde pública a fim de evitar contato com esses animais e/ou seu habitat. Além do tatu, manifestações clínicas da PCM têm sido recentemente reportadas em cães (Ricci *et al.*, 2004).

A PCM é restrita a América Central e Latina com uma distribuição não uniforme, estendendo-se do México até a Argentina, não havendo registro desta doença na Nicarágua, Guiana, Chile ou Suriname (Restrepo, 1985). O Brasil é o centro endêmico, contando com 80% dos casos relatados, sendo os estados de São Paulo, Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso os mais afetados. Além desses estados, a região Norte, notadamente a Amazônia, com a abertura de novas fronteiras agrícolas também contribui para o atual panorama da micose (Coutinho *et al.*, 2002). Acometendo principalmente a população rural, devido possivelmente ao contato contínuo com o habitat de *P. brasiliensis*, a PCM é a oitava causa de mortalidade por doença crônica, entre as infecciosas e parasitárias, e a primeira entre as micoses sistêmicas no Brasil (Coutinho *et*

al., 2002). Essa micose tem sua importância em saúde coletiva ligada aos custos sociais e econômicos derivados não apenas da doença em atividade, que ocorre principalmente em indivíduos na fase mais produtiva da vida, como também das freqüentes seqüelas secundárias a essa micose, motivo comum de incapacitação para o trabalho. A PCM é na maioria dos casos assintomática, evoluindo em cerca de 2% dos indivíduos infectados cujo número em toda América Latina é estimado em 10 milhões (McEwen *et al.*, 1995). O desenvolvimento da doença depende principalmente da virulência do patógeno, da suscetibilidade genética e do estado imunitário do hospedeiro. O padrão do granuloma formado e os órgãos envolvidos na resposta a diferentes isolados de *P. brasiliensis* em infecções experimentais (Zaccharias *et al.*, 1986; Singer-Vermes *et al.*, 1989) exemplificam o fator relacionado à virulência do patógeno. A suscetibilidade genética pôde ser demonstrada tanto para modelo experimental (Calich *et al.*, 1987), no qual um único gene autossômico dominante parece determinar resistência bem como em estudos clínicos, nos quais vários autores mostraram uma influência de determinados antígenos de histocompatibilidade no desenvolvimento da PCM (Restrepo *et al.*, 1983; Lacerda *et al.*, 1988; Goldani *et al.*, 1991; Sadahiro *et al.*, 2007). Ademais, o polimorfismo de genes que codificam importantes citocinas no controle da PCM também estaria envolvido na suscetibilidade a essa micose em humanos (Bozzi *et al.*, 2006).

Após a entrada e o estabelecimento no hospedeiro, o fungo induz lesões pulmonares primárias, as quais podem permanecer inaparentes ou levar ao desenvolvimento da doença propriamente dita. A primeira possibilidade constitui a PCM-infecção, definida como sendo uma infecção assintomática em indivíduos sadios que vivem em área endêmica e são reativos ao teste cutâneo com paracoccidioidina. Por outro lado, nos indivíduos que desenvolvem a doença, as manifestações clínicas são diversas (Brummer *et al.*, 1993; Franco *et al.*, 1993). De um modo geral, podem ser caracterizadas duas formas clínicas da PCM: a aguda (juvenil) e a crônica (adulto). A forma aguda, apresentação clínica responsável por 3 a 5% dos casos da doença, acomete principalmente jovens de ambos os sexos e é caracterizada por uma evolução rápida e severa. Envolve principalmente o sistema retículo-endotelial (linfadenomegalia e hepatoesplenomegalia), além do comprometimento ósteo-articular e lesões cutâneas. De maneira diferente da forma crônica, frequentemente é indicado em biópsias de pacientes da forma juvenil um grande número de *P. brasiliensis* em multiplicação sem a formação de granuloma. Além disso, os pulmões são raramente afetados. Na forma crônica, a forma mais comum de apresentação clínica da PCM, a evolução dá-se de modo lento e silencioso o que prejudica o

diagnóstico precoce. Em 90% dos pacientes, geralmente adultos do sexo masculino, as lesões granulomatosas pulmonares estão presentes. Em 25% dos casos, os pulmões são os únicos órgãos clinicamente afetados (forma crônica unifocal). Os sintomas respiratórios são inespecíficos e incluem tosse, expectoração, perda de fôlego, sendo que anorexia, febre e perda de peso são também usualmente relatados. Entretanto, em alguns casos, o envolvimento pulmonar unifocal é silencioso, o que leva os pacientes procurarem cuidados médicos somente após a disseminação do fungo, via corrente sanguínea e/ou sistema linfático, ter ocasionado lesões extra-pulmonares (forma crônica multifocal). Nessa forma clínica, os sintomas são variáveis e estão relacionados a mais de um órgão ou sistema, sendo que as lesões frequentemente ocorrem na mucosa oral e nasal, pele, linfonodos e glândulas adrenais (Franco *et al.*, 1993; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

A incidência da PCM é, dependendo da área endêmica, 17 a 83 vezes maior em adultos do sexo masculino quando comparados aqueles do sexo feminino. O fato desse perfil não ser verificado em indivíduos infectados antes da puberdade (Kerr *et al.*, 1984; Restrepo, 1984), e que a exposição ao fungo é praticamente igual para ambos os sexos, levou à hipótese de que os hormônios sexuais femininos interferem na infecção do fungo. De fato, Restrepo *et al.* (1984), Salazar *et al.* (1988) e Sano *et al.* (1992) mostraram a presença de proteínas que atuam como receptores do 17 β -estradiol no citosol das células fúngicas. Esses estudos demonstraram, *in vitro*, que esse estrógeno tem a capacidade de inibir a transição do micélio para levedura. Posteriormente, Aristizabal *et al.* (1998) demonstraram que camundongas infectadas por via intranasal com conídios de *P. brasiliensis* inibiram a transformação dessas células para levedura. Observações realizadas entre 72 e 96 horas após infecção revelaram em camundongos quantidades decrescentes de conídios com um aumento expressivo de leveduras, enquanto que em camundongas apenas conídios eram observados. Esses resultados *in vivo* confirmam um papel importante do 17 β -estradiol na resistência inata de fêmeas à infecção pelo *P. brasiliensis*.

O tratamento da PCM deve incluir, além da terapêutica antifúngica específica, ações de apoio às complicações clínicas associadas ao envolvimento de diferentes órgãos e/ou sistemas pela micose. A ausência de tal terapia é usualmente fatal. Atualmente, as drogas de escolha são os derivados imidazólicos e triazólicos (principalmente itraconazol, cetoconazol e fluconazol), já que as sulfonamidas e a anfotericina B tem baixa taxa de aderência ao tratamento pelos pacientes devido aos efeitos colaterais mais exarcebados (Hahn & Hamdan, 2000; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2002; 2006). Os antifúngicos azólicos inibem as enzimas da via biossintética do ergosterol,

alterando a permeabilidade da membrana celular do fungo. Apesar de essas drogas apresentarem uma ação terapêutica de efeito fungistático cessando a progressão da PCM, a seqüela fibrótica resultante persiste constituindo uma potencial fonte de fungo, a qual pode levar a reativação da doença após o término do tratamento. De fato, uma característica importante de *P. brasiliensis* está na sua habilidade de iniciar a infecção após um longo período de latência (Brummer *et al.*, 1993).

2.2. Fatores de virulência em fungos causadores de micose sistêmicas

A palavra ‘virulência’ tem a mesma origem latina da palavra ‘vírus’, a qual originalmente referia-se a qualquer patógeno que causava doença. Dessa maneira, virulência seria uma propriedade intrínseca distinguindo microrganismos patogênicos de não patogênicos. Porém, essa idéia clássica vem sendo alterada pelo fato das crescentes evidências de que fatores do hospedeiro são essenciais determinantes no desenrolar das interações parasita-hospedeiro, pois microrganismos considerados virulentos não são patogênicos em hospedeiros com imunidade específica, enquanto os que são geralmente avirulentos causam doença em hospedeiros imunossuprimidos. Por exemplo, isolados do fungo *Cryptococcus neoformans* que não possuem cápsula de polissacarídeo (principal fator de virulência desse fungo) são avirulentos para camundongos imunocompetentes, porém causam meningoencefalite similar àquela causada por isolados encapsulados em camundongos imunossuprimidos (Salkowski *et al.*, 1991; Chang & Kwon-Chung, 1994;). Dessa maneira, virulência não é uma característica microbiana distinta e invariável, e sim um fenômeno complexo, dinâmico e mutável que inclui fatores tanto do hospedeiro como do micróbio. Baseado nesse contexto Casadevall & Pirofski (1999, 2001) redefiniram o conceito de virulência em a capacidade relativa de um microrganismo causar dano ao hospedeiro, sendo a virulência unicamente observada em um hospedeiro susceptível.

Estima-se que haja aproximadamente 150.000 espécies de fungos com apenas 270 descritas como sendo capazes de causar doença em humanos. As infecções fúngicas parecem ser acidentais em sua natureza e a maioria é adquirida por exposição à fonte natural do fungo, sendo poucas as transmitidas por contato homem a homem, sendo sugerido que não haveria pressão evolucionária seletiva para os fungos desenvolverem habilidades específicas para invasão, infecção e disseminação no hospedeiro mamífero (Steele, 1991). Entretanto, um fungo para ser patogênico deve sobreviver, crescer e causar doença no hospedeiro. Dessa maneira, alguns

fungos possuem certos fatores de virulência que os fornecem uma oportunidade para infecção dos hospedeiros mamíferos. Entre esses fatores há aqueles desenvolvidos inicialmente para uso nos habitats naturais, porém tornaram-se úteis no hospedeiro mamífero como descrito nos trabalhos de Steenbergen *et al.* (2001, 2004) e Mylonakis *et al.* (2002). Os resultados desses trabalhos sugerem que a virulência de *C. neoformans*, *B. dermatitidis*, *Sporothrix schenckii* e *H. capsulatum* seja uma consequência de adaptações que evoluíram para proteção desses fungos contra predadores ambientais como as amebas e nematóides. A ameba *Acanthamoeba castellanii*, assim como os macrófagos dos vertebrados, internalizam partículas em vacúolos e secretam enzimas lisossomais que digerem essas partículas (Swanson & Hammer, 2000). *A. castellanii* rapidamente internaliza o *C. neoformans*, o que resulta na morte da ameba (Steenbergen *et al.* 2001). Entretanto, o principal achado desse estudo foi que após a internalização, esse fungo replica e forma vesículas contendo polissacarídeos como descrito na sua interação com macrófagos murinos e humanos. Ademais, isolados mutantes de *C. neoformans* deficientes geneticamente para dois importantes fatores de virulência (cápsula e fosfolipase) não foram capazes de sobreviver no interior da ameba. Essas observações mostram que os fatores de virulência requeridos nos hospedeiros mamíferos também são fatores de virulência em amebas, sugerindo que a estratégia de sobrevivência intracelular usada por *C. neoformans* em macrófagos de mamíferos é consequência da seleção evolutiva para a sua sobrevivência contra a predação por esses protozoários no solo. Resultados semelhantes foram obtidos quando do estudo da interação de *A. castellanii* com *B. dermatitidis*, *S. schenckii* e *H. capsulatum* (Steenbergen *et al.* 2004). Considerando seu habitat saprófita e a proximidade filogenética com *H. capsulatum* e *B. dermatitidis* estudos avaliando a possível influência de tais predadores na aquisição e manutenção da virulência em *P. brasiliensis* são necessários. Nesse contexto, à medida que o nosso conhecimento sobre a patologia molecular de fungos progredir poucos determinantes clássicos de virulência, como aqueles descritos para bactérias, requeridos especificamente para evadir a resposta imune específica do hospedeiro serão achados (Casadevall *et al.*, 2003); pesquisadores provavelmente encontrarão características desenvolvidas ou adquiridas para uma versatilidade fisiológica e nutricional que simplesmente garantam a sobrevivência no ambiente do hospedeiro mamífero.

O teste ideal para avaliação de um fator de virulência é comparar as respostas biológicas em fungos com e sem tal fator. Tais comparações têm tradicionalmente requerido o desenvolvimento de isolados mutantes obtidos por mutagênese química ou por luz ultravioleta e

ainda por seleção de mutantes de ocorrência natural. Um grande obstáculo dessa abordagem é que o mutante pode ser deficiente não só no fator em estudo; isso devido ao fungo apresentar múltiplas mutações ou um defeito geral e não específico. Porém, a disponibilidade da seqüência parcial ou total do genoma de fungos como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *H. capsulatum* e *Coccidioides immitis* e sistemas de transformação e nocaute gênico eficientes vêm fornecendo ferramentas moleculares importantes para o entendimento da patogênese fúngica (Kwon-Chung, 1998; Lorenz, 2002; Magee *et al.*, 2003; Rappleye & Goldman, 2006).

O estudo padrão da patogênese molecular em fungos baseia-se no postulado molecular de Koch, originalmente descrito para identificação de genes de virulência em bactéria (Falkow, 2004). Esse postulado pode ser resumido da seguinte forma: (i) um fenótipo ou atributo é observado e o gene em controle identificado e clonado (ii) o gene é especificamente rompido (nocauteado) ou silenciado por meio de recombinação homóloga e pela técnica de RNA de interferência (RNAi), respectivamente, criando um mutante nulo (iii) o gene é reposto no mutante nulo a fim de reconstituir o fenótipo. Finalmente, os três isolados (tipo parental ou selvagem, nulo e reconstituído) são introduzidos em um modelo animal bem estabelecido para observar o impacto na infecção. Para que um gene seja considerado de virulência deve haver atenuação ou perda da capacidade do isolado mutante nulo em promover doença, quando comparado aos isolados do tipo parental e reconstituídos. É importante ressaltar que um mutante nulo para um determinado gene de virulência é diferente daquele para genes essenciais, já que o primeiro pode ser cultivado *in vitro*, porém tem sua sobrevivência atenuada ou perdida quando introduzido no ambiente do hospedeiro. Apesar de recentes esforços (Leal *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2005) a falta de um sistema de transformação e nocaute gênico eficiente é um importante fator que dificulta o nosso conhecimento sobre a virulência molecular na micose sistêmica causada pelo fungo *P. brasiliensis*. Entretanto, essa abordagem tem sido realizada com sucesso em outros fungos patogênicos causadores de micoses sistêmicas, gerando importantes informações sobre os mecanismos moleculares responsáveis por vários atributos ou fatores de virulência, como dimorfismo, componentes polissacarídeos da parede celular, termotolerância, moléculas de adesão celular, produção de enzimas extracelulares entre outros (Hogan *et al.*, 1996; Kurokawa *et al.*, 1998; van Burik & Magee, 2001; Navarro-Garcia *et al.*, 2001; Odds *et al.*, 2001; Lorenz, 2002; Rappleye & Goldman, 2006).

A associação entre morfogênese e virulência em fungos dimórficos como *B. dermatitidis*, *C. immitis*, *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* e *Penicillium marneffeii* tem sido relatada extensivamente na literatura devido ao fato de isolados mutantes naturais, os quais não transitam entre a forma saprófita de micélio para levedura, serem avirulentos em modelos experimentais (Medoff *et al.*, 1986; Franco *et al.*, 1993; Gow *et al.*, 2002; Rooney & Klein, 2002). Além disso, a levedura é a única forma desses fungos que é encontrada parasitando os tecidos de seus hospedeiros. Dessa maneira, esse processo de transformação é essencial para o estabelecimento da infecção e desenvolvimento da doença, provavelmente por refletir mudanças adaptativas as quais permitem a sobrevivência desses fungos no novo ambiente do hospedeiro. Um importante mecanismo molecular que regula o dimorfismo só foi esclarecido recentemente. Em um estudo considerado um marco na micologia, Nemecek *et al.* (2006) identificaram um gene (*dimorphism-regulating histidine kinase-drk1*) cujo produto é essencial no sensoramento dos sinais fornecidos pelo hospedeiro para induzir a transição da forma de micélio para a de levedura em *B. dermatitidis* e *H. capsulatum*. Além de ser essencial para o dimorfismo, a utilização de isolados mutantes nulos para o gene *drk1* demonstrou um importante papel dessa histidina quinase na regulação da integridade da parede celular e da expressão de genes de virulência *in vivo*. Considerando esses efeitos, os autores postularam que a virulência de *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* não expressando *drk1* estaria comprometida. De fato, a virulência dos mutantes nulos em um modelo murino de infecção pulmonar letal foi drasticamente reduzida, como constatado pela análise da curva de sobrevivência dos animais infectados e o número de unidades formadoras de colônia (UFC) recuperadas de seus pulmões. A importância desse trabalho também reside no fato de que não há homólogos de DRK1 em humanos. Assim, a atividade dessa quinase pode ser um importante alvo para o desenvolvimento de um anti-fúngico de largo espectro de ação. Um dos genes de virulência cuja expressão era regulada por DRK1 e aquele que codifica para α -1,3 glicana sintase (*ags1*). A α -glicana é um componente polissacarídeo específico da parede celular da forma de levedura dos fungos dimórficos. Diversas evidências indiretas têm demonstrado que a α -glicana pode ser um importante fator de virulência em *P. brasiliensis*: (i) a virulência de diferentes isolados desse fungo é proporcional ao conteúdo de α -glicana presente na parede celular, de tal maneira que isolados altamente virulentos chegam a ter 40% do peso total da parede do fungo formada por esse polímero de glicose, enquanto que os de baixa virulência 3-5% (San-Blas & San-Blas, 1977; Hallak *et al.*, 1982) (ii) o cultivo *in vitro* por longos períodos de tempo de isolados virulentos leva a uma

diminuição da quantidade de α -glicana e perda da virulência (iii) a localização na camada mais externa da parede do fungo sugere um papel de proteção contra os fagócitos (Kanetsuna and Carbonell, 1970; San-Blas & San-Blas, 1977; 1987). Rappleye *et al.* (2004) associou diretamente a α -glicana como importante na virulência fúngica ao utilizar a técnica de RNAi para silenciar a expressão do gene *ags1* em *H. capsulatum*. O silenciamento desse gene tornou as leveduras de *H. capsulatum* mais susceptíveis à destruição *in vitro* por macrófagos e incapazes de colonizar os pulmões de camundongos após infecção por via intranasal.

A habilidade dos fungos patogênicos em crescer na temperatura corporal do hospedeiro humano é obviamente um requerimento essencial para o estabelecimento de infecções sistêmicas. Esse fenômeno conhecido como termotolerância distingue *C. neoformans* var. *gatii* da var. *neoformans*. O primeiro não cresce eficientemente a 37 °C e não é capaz de causar infecção letal em camundongos, ao passo que o segundo cresce facilmente a essa temperatura com conseqüente estabelecimento e desenvolvimento de doença (Rhodes, 1988). Nesse fungo, a proteína calcineurina fosfatase dependente de Ca^{2+} /calmodulina parece ser requerida para o crescimento a 37 °C, pois o tratamento com ciclosporina e FK506 a essa temperatura, mas não a 24 °C, impede o crescimento do fungo. Além disso, um isolado mutante nulo para a subunidade catalítica da calcineurina não sobrevive *in vitro* a 37 °C e torna-se avirulento em um modelo animal de meningite criptocócica (Odom *et al.*, 1997a, b). Nesse contexto, nosso grupo identificou e clonou o gene da calmodulina de *P. brasiliensis*, e demonstrou que inibidores da atividade dessa proteína eram capazes de prejudicar a transição de micélio para levedura (de Carvalho *et al.*, 2003).

A adesão de fungos as células/tecido do hospedeiro é considerada um importante passo inicial na colonização e disseminação desses patógenos no hospedeiro susceptível (Mendes-Giannini *et al.*, 2000). Em *P. brasiliensis*, um ensaio *in vitro*, utilizado na avaliação da adesão de leveduras desse fungo a células epiteliais de mamíferos, estabeleceu uma relação direta entre a capacidade de aderência com a virulência dos diferentes isolados fúngicos utilizados (Hanna *et al.*, 2000). A adesão de *P. brasiliensis* a essas células é substancialmente reduzida na presença de anticorpos específicos à glicoproteína de 43-kDa (gp43) presente na parede do fungo. Além da sua atuação como adesina, a gp43 é o principal componente antigênico do *P. brasiliensis* (Travassos *et al.*, 1995). O alvo da gp43 como adesina é a laminina, a principal proteína da matriz extracelular na membrana basal dos tecidos de mamíferos, de tal maneira que leveduras cobertas com laminina têm uma maior capacidade de disseminação, causando uma doença mais

severa em hamsters (Vicentini *et al.* 1994). Recentemente, Gonzalez *et al.* (2005) demonstraram a presença de dois polipeptídios na superfície de conídios de *P. brasiliensis* capazes de interagir com proteínas da matriz extracelular como a laminina, fibronectina e fibrinogênio. Esses polipeptídios, atuando como adesinas, podem ser cruciais para a aderência inicial dos conídios no parênquima pulmonar e talvez também para a disseminação do fungo. O papel das adesinas na virulência fúngica tem sido inequivocamente comprovado por meio da utilização de mutantes nulos para essas proteínas, principalmente em *C. albicans* e *C. immitis* (Sundstrom, 1999; Staab *et al.*, 1999; Hoyer, 2001; Hung *et al.*, 2002).

A secreção de enzimas hidrolíticas, como as proteinases e fosfolipases, também é considerada um importante fator que contribui para a virulência de fungos causadores de micose sistêmica. Essas enzimas degradam a membrana celular e a matriz extracelular do hospedeiro, contribuindo assim para a disseminação e invasão tecidual (Hube *et al.*, 1998; Ghannoum, 2000). Evidências indiretas de que as fosfolipases são fatores de virulência em *C. albicans* foi inicialmente descrito por Ibrahim *et al.* (1995). Esses autores descreveram que o nível de produção dessa enzima por nove diferentes isolados estava diretamente relacionado com a gravidade da doença causada em um modelo murino de candidíase. A fim de elucidar um papel direto da fosfolipase na virulência de *C. albicans*, o gene *plb1* que a codifica foi clonado e caracterizado, proporcionando a criação de mutantes deficientes para esse gene (Leidich *et al.*, 1998). Esses mutantes não apresentavam problemas de crescimento, morfologia ou aderência. Entretanto, a sua habilidade de penetrar em células endoteliais e epiteliais humanas era bastante comprometida. Em *C. neoformans* a deleção de *plb1* causou uma evidente perda da virulência em modelo murino de infecção por inalação (Cox *et al.*, 2001), provavelmente pelo fato do surfactante pulmonar ser um excelente substrato para a fosfolipase (Santangelo *et al.*, 1999).

2.3. A imunobiologia da PCM e outras micoses sistêmicas

A defesa imunológica do hospedeiro mamífero contra as micoses sistêmicas é complexa e multifatorial, dependendo de mecanismos inatos e adaptativos (Huffnagle & Deepe, 2003; Romani, 2004). Os elementos inatos constitutivos incluem a pele (barreira física e química) e as superfícies epiteliais das mucosas respiratórias, gastrointestinal e urinárias. Ademais, proteínas como colectinas, do complemento e anticorpos naturais opsonizam as células fúngicas, facilitando a fagocitose pelas células fagocitárias profissionais da defesa imunológica inata: as

células dendríticas (DC, *dendritic cells*), neutrófilos, e macrófagos/monócitos (Mecizhitov & Janeway, 1997; Romani, 2004). Outras células como o linfócito T citotóxico natural (NK, *natural killer*), o linfócito T $\gamma\delta$ e as células de origem não hematopoiéticas como as endoteliais e epiteliais também têm um papel importante na imunidade inata. A importância de qualquer um desses mecanismos na resistência às infecções fúngicas sistêmicas podem variar conforme o agente infeccioso. De tal maneira que os fatores da resposta inata teriam uma maior importância na ação contra os fungos oportunistas como *C. albicans*, *A. fumigatus*, *C. neoformans* do que contra fungos patogênicos primários como *C. immitis*, *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* e *P. brasiliensis* (Schaffner *et al.*, 1986; Cutler *et al.*, 2007).

A imunidade adaptativa é, para efeito didático, dividida em resposta celular ou humoral. A imunidade celular é orquestrada principalmente pela subpopulação de linfócito T auxiliar ou *helper* CD4+ 1 (Th1) enquanto que a humoral pela Th2. Nas últimas décadas, diversos trabalhos vêm demonstrando que a resistência aos fungos causadores de micoses sistêmicas como *C. albicans*, *A. fumigatus*, *C. neoformans*, *C. immitis*, *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* e *P. brasiliensis*, está associada a uma resposta imunológica celular efetiva, enquanto que a suscetibilidade a uma resposta predominantemente humoral (Romani, 2004).

Na PCM humana e experimental ocorre uma extensa variação da resposta imunológica, cujo grande espectro de manifestações clínicas depende principalmente do nível de supressão da imunidade celular. Assim, formas severas de PCM são caracterizadas por distúrbios imunológicos como alterações na razão de subpopulações de linfócitos T, hipersensibilidade do tipo tardia (DTH, *delayed type hypersensitivity*) prejudicada, produção de citocinas que inibem o desenvolvimento de uma resposta imune celular efetiva e supressão da proliferação de linfócitos T (Mok & Greer, 1977; Bava *et al.*, 1991; Benard *et al.*, 1996, 1997, 2001; Bocca *et al.*, 1998; Marques-Mello *et al.*, 2002; Campanelli *et al.*, 2003; Cavassani *et al.*, 2006; Bordon *et al.*, 2007b).

O conceito de subpopulações funcionalmente distintas de linfócitos T CD4+ (Th1 e Th2), fundamentado principalmente no perfil de citocinas secretadas, tem sido bastante útil para o entendimento dos mecanismos de defesa imunológica em infecções e também no planejamento de estratégias terapêuticas (Seder & Paul, 1994; Mosmann & Sad, 1996; Jankovic *et al.*, 2001; Kidd, 2003). As diferentes citocinas secretadas por essas subpopulações de linfócitos T instruem uma resposta imunológica predominantemente celular ou humoral. Durante uma resposta imunológica a agentes infecciosos, em muitos casos, não há uma absoluta restrição na ativação

de linfócitos Th1 ou Th2. Entretanto, em algumas enfermidades, há uma clara dominância de uma ou outra subpopulação de linfócitos auxiliares, e uma falha na ativação da subpopulação apropriada pode ocasionar resultados desastrosos para o hospedeiro.

Os linfócitos Th1 e Th2 diferenciam-se a partir de uma célula T precursora denominada de Th0, caracterizada por secretar interleucina IL-4 e o interferon gama (IFN)- γ . A diferenciação desse precursor em Th1 ou Th2 é dirigida principalmente, mas, não unicamente pelas citocinas (IL-12 para Th1 e IL-4 para Th2) produzidas por células do sistema imunológico inato logo após a infecção. Desse modo, em uma resposta típica à infecção fúngica, ocorre uma produção de IL-12 pelas DCs e macrófagos seguida pela produção de IFN- γ , em resposta a IL-12, por linfócitos NK. Esse cenário induz uma resposta mediada por Th1, que caracteriza a imunidade celular. Por outro lado, a produção inicial de IL-4 pelas DCs ou por outros leucócitos como basófilos, mastócitos ou eosinófilos direciona uma resposta do tipo Th2, a qual caracteriza a imunidade humoral (d'Ostiani *et al.*, 2000; Maldonado-López & Moser, 2001; Kidd, 2003; Romani, 2004). O fenótipo da célula fúngica, a carga antigênica, o subtipo da DC, o receptor utilizado pelas DC, o *background* genético, tanto do fungo como do hospedeiro e o microambiente co-estimulatório são alguns dos fatores que contribuem para a polarização de uma resposta imune ser celular ou humoral (Kuchroo *et al.*, 1995; d'Ostiani *et al.*, 2000; Maldonado-López & Moser, 2001; Bozza *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2003; Huffnagle & Deepe, 2003; Romani, 2004). Nesse sentido, as DCs têm um papel essencial na instrução da resposta imune adaptativa (Romani *et al.*, 2002). Essas células residem, na sua forma imatura, nos tecidos periféricos e órgãos ativamente reconhecendo, capturando e processando antígenos derivados de patógenos. Após o estímulo antigênico (lipopolissacarídeo (LPS), por exemplo), as DCs iniciam seu processo de maturação e migram para os órgãos linfóides secundários (linfonodos e baço) a fim de apresentar os antígenos, no contexto de moléculas de CPH (complexo principal de histocompatibilidade), aos linfócitos raros virgens antígeno-específicos Th0 (Hartgers *et al.*, 2000). A maturação das DCs é caracterizada pela perda na capacidade de capturar e processar antígenos e pelo aumento na expressão de moléculas CPH, co-estimulatórias e de adesão. O processo de reconhecimento dos antígenos depende dos receptores de reconhecimento de padrões (PRR, *pattern recognition receptors*) presente em grande diversidade na membrana plasmática de DCs. Os PRRs reconhecem moléculas estruturais invariantes comum a um grande número de patógenos, conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*) (Janeway & Medzhitov, 2002). O principal PRR é a família de receptores

Toll-like (TLR), os quais também estão presentes em macrófagos e neutrófilos. Os TLRs são uma classe de proteínas transmembrana que reconhecem determinados PAMPs ativando vias de sinalização celulares, o que resulta na indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias e moléculas co-estimulatórias (Pasare & Medzhitov 2004; Levitz, 2004). Diversos componentes da parede celular de vários fungos, como glicoronoxilomanana e fosfolipomanana, atuam como PAMPs reconhecidos pelos TLRs de DCs e macrófagos (Romani *et al.*, 2002; Kopp & Medzhitov 2003). Além dos TLRs, receptores como dectina-1, que reconhece β -glicana, o receptor para manose (MR, *mannose receptor*) e os que reconhecem moléculas opsonizadoras (receptor do complemento 3 -CR3 ou CD11b/CD18- e o receptor da porção Fc de IgG -Fc γ R-) também atuam no sensoriamento de células fúngicas pelas DCs e macrófagos (Romani *et al.*, 2002; Romani, 2004; Brown, 2006). Estudos recentes avaliaram o ação das DCs na PCM. Ferreira *et al.* (2004) demonstraram que a fagocitose de *P. brasiliensis* por essas células é mediado, em grande parte, pelo receptor de manose. Interessantemente, a infecção pelo fungo e a introdução exógena da gp43 levaram a uma inibição da produção de IL-12 e TNF- α pelas DCs. Além disso, as moléculas de CPH e de adesão também tinham sua expressão diminuída. Dessa maneira, a gp43 poderia estar relacionada ao desenvolvimento de uma resposta não protetora humoral (Th2). De fato, camundongos susceptíveis imunizados com DCs estimuladas com gp43 e LPS apresentavam uma doença mais severa, caracterizada por uma carga fúngica pulmonar elevada e granulomas difusos e frouxos, quando comparado com os camundongos controles que receberam DCs estimuladas com LPS somente (Ferreira & Almeida, 2006). Esses resultados corroboram os achados de Almeida & Lopes, (2001). Esses autores demonstraram que camundongos suscetíveis à infecção por *P. brasiliensis* caracterizavam-se pela menor eficiência de suas DCs e macrófagos em estimular a proliferação e secreção de citocinas por linfócitos Th1.

Linfócitos Th1 produzem IFN- γ , fator de necrose tumoral alfa e beta (TNF, *tumor necrosis factor*- α e - β) e IL-2, enquanto que linfócitos Th2 produzem as interleucinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 (Seder & Paul, 1994; Jankovic *et al.*, 2001; Kidd, 2003). A IL-10 é frequentemente classificada como uma citocina do tipo Th2 em camundongo, porém no homem tanto os linfócitos Th1 e Th2 secretam IL-10 (Katsikis *et al.*, 1995; Zhai *et al.*, 1999). Outra subpopulação de célula T “helper”, com um padrão de secreção de citocina único, é a célula Th3, um linfócito T CD4+CD25+ imunoregulador (Treg) que secreta o fator transformador do crescimento-beta (TGF, *transforming growth factor* - β) e IL-10 (Letterio & Roberst, 1998). Há fortes evidências de que as Treg sejam especializadas na atenuação das respostas imunológicas,

tendo como função principal uma regulação ou supressão das respostas mediadas por linfócitos Th1 e Th2. Uma atividade supressora dessas células foi recentemente reportada em pacientes com PCM, agindo principalmente na atenuação da capacidade proliferativa de linfócitos T alogênicos (Cavassani *et al.*, 2006).

As citocinas secretadas pelos linfócitos Th1 são vitais para uma resposta imune celular efetiva contra os fungos causadores de micose sistêmica, devido principalmente à secreção de IFN- γ que ativa macrófagos (principal célula efetora da imunidade celular) a um estado microbicida ótimo e IL-2 que estimula a proliferação de células T CD8+ (Murray, 1990; 1994; Cano *et al.* 1998; 2000; Kawakami *et al.*, 1996; Allendoerfer *et al.*, 1997; Lavigne *et al.*, 1998 e ver item 2.3 da introdução). No camundongo, o IFN- γ também induz a produção de subclasses de imunoglobulinas G (IgG2a e IgG3), as quais contribuem para imunidade antifúngica por meio de suas atividades acentuadas de fixação de complemento e opsonização, e em sinergia com TNF- α induz um aumento significativo da função fungicida dos macrófagos (Beaman, 1991; Aguirre *et al.*, 1995). Ademais, o IFN- γ e o TNF- α são essenciais para a indução da migração de leucócitos e sua diferenciação (monócitos em macrófagos) no foco inflamatório, como na formação de granuloma, por meio da indução da expressão de quimiocinas (pequenas citocinas quimiotáticas) e seus receptores (Zlotnik & Yoshie, 2000; Chensue, 2001). Após inalação, o estabelecimento de *P. brasiliensis* no tecido pulmonar induz uma resposta inflamatória que leva a formação de granuloma, o qual é definido como uma coleção compacta de células do sistema fagócito mononuclear (macrófagos), podendo sofrer diferenciação para células epitelióides e gigantes. Linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e fibroblastos também podem estar presentes (Williams & Williams, 1983; De Brito & Franco, 1994). Na formação de granuloma *in vitro* em resposta a gp43 de *P. brasiliensis*, Vigna *et al.* (2006) revelaram que a interação de linfócitos B-1b com macrófagos é essencial. O granuloma é a lesão fundamental na PCM e como em outras doenças infecciosas (tuberculose, hanseníase, esquistossomose e histoplasmose) é resultado de DTH (Williams & Williams, 1983; De Brito & Franco, 1994; Perez *et al.*, 2003), sendo essencial para destruição e contenção do fungo, a fim de evitar sua disseminação pelo organismo. De forma semelhante ao que tem sido mostrado para a histoplasmose (Allendoerfer & Deepe, 1997; 1998), a formação e manutenção do granuloma na PCM experimental dependem da presença de IFN- γ e TNF- α . Cano *et al.* (1998) demonstraram que animais tratados com anticorpos monoclonais anti-IFN- γ , tinham o parênquima pulmonar quase totalmente substituído por granulomas extensos e frouxos contendo inúmeras células leveduriformes. Souto *et al.* (2000),

utilizando camundongos deficientes geneticamente para IFN- γ e para o receptor p55 de TNF- α , observaram um infiltrado inflamatório composto de poucos neutrófilos, macrófagos e células epitelióides formando granulomas incipientes com grande número de leveduras do fungo e disseminação. Recentemente, Souto *et al.* (2003), novamente utilizando camundongos deficientes geneticamente para IFN- γ , demonstraram o papel essencial dessa citocina na formação do granuloma por meio do controle da expressão de quimiocinas e seus receptores com o conseqüente recrutamento de leucócitos nos pulmões de camundongos infectados pelo *P. brasiliensis*. A importância do TNF- α no granuloma também foi demonstrada também para humanos, pois utilizando células mononucleares do sangue periférico de pacientes (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) com PCM demonstrou-se que a formação *in vitro* de granuloma, em resposta a diferentes frações antigênicas de *P. brasiliensis*, estava associado a uma maior produção de TNF- α (Diniz *et al.*, 2001).

Os linfócitos Th2 produzem citocinas controladoras da ativação e diferenciação de linfócitos B em plasmócitos (células secretoras de anticorpos); demonstrando a sua importância na indução da resposta imune humoral. A IL-4 controla a troca de classe de imunoglobulina para IgE, tendo assim um papel central na defesa contra helmintos e na regulação da resposta alérgica. Estimula também produção de subclasses de IgG (IgG1 em camundongo) que neutralizam, porém não opsonizam antígenos. A citocina IL-5, juntamente com TGF- β , induz a mudança de isotipo de células B para IgA, constituindo-se na subclasse de imunoglobulina predominante nas secreções e mucosas dos tratos intestinal e respiratório. A IL-5 ainda contribui para controle de infecção por helmintos através da ativação de eosinófilos e mastócitos (Mosmann & Sad, 1996; Lalani *et al.*, 1999). Apesar do interesse inicial nos linfócitos Th2 ter sido direcionado para seu papel em infecções por helmintos e nos processos alérgicos, tem-se dado uma maior importância para o seu papel regulatório (antiinflamatório) na limitação dos efeitos danosos dos linfócitos Th1 aos tecidos.

As citocinas características produzidas pelos linfócitos Th1 e Th2 são mutualmente inibitórias tanto para a diferenciação como na execução da função efetora do fenótipo recíproco. Assim, IFN- γ inibe proliferação de linfócitos Th2 por meio da redução da expressão de IL-1, do receptor para IL-4 e da própria IL-4; enquanto que IL-4 e IL-10 inibem a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas, IL-2 e da subunidade β 2 do receptor de IL-12 dos linfócitos Th1, prejudicando diferenciação e proliferação dos mesmos (Fernandez-Botran *et al.*, 1988; Gajewski & Fitch, 1988; Powrie & Coffman, 1993; Launois *et al.*, 1997; Szabo *et al.*, 1997). Na

PCM humana, Romano *et al.* (2005) observaram que a expressão da subunidade $\beta 2$ do receptor de IL-12 está significativamente reprimida, pela ação da IL-10, em pacientes crônicos quando comparados com indivíduos sadios de áreas endêmicas da PCM. As citocinas IL-4 e IL-10 ainda inibem a síntese de IL-1, TNF- α e IL-6 e a produção dos reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio por fagócitos (De Waal Malefyt *et al.*, 1991; Fiorentino *et al.*, 1991; Oswald *et al.*, 1992; O'Garra & Murphy, 1996). Condizente com esse papel, Costa *et al.*, (2007) observaram *in vitro* que a IL-10 inibe o processo de destruição de células leveduriformes de *P. brasiliensis* por neutrófilos humanos por meio da redução da produção de peróxido de hidrogênio.

O estabelecimento do modelo murino isogênico da paracoccidiodomicose e a caracterização de linhagens resistentes e suscetíveis (Calich *et al.*, 1985) vem permitindo um maior entendimento da resposta protetora para essa micose. Após infecção intraperitoneal, intratraqueal, e endovenosa a análise de vários parâmetros demonstrou que a linhagem resistente A/Sn e a suscetível B10.A desenvolveram características similar às aquelas observadas, respectivamente, nas formas localizada e disseminada da PCM crônica em humanos. No camundongo resistente, a infecção era caracterizada por uma ativação evidente de macrófagos e neutrófilos, baixos níveis de anticorpos específicos para *P. brasiliensis*, ausência de antigenemia (Singer-Vermes *et al.*, 1993), evidentes DTH específicas (Fazioli *et al.*, 1994) e poucos granulomas compactos com número reduzido de fungos. Nos animais suscetíveis havia grande quantidade de anticorpos, antigenemia crescente, depressão de reações DTH e granulomas difusos e com grande quantidade de fungos. Como todas as atividades expostas são predominantemente reguladas pelo IFN- γ , a resistência na PCM estaria sob controle da subpopulação Th1 de linfócitos. A importância do IFN- γ na PCM foi demonstrada através de sua depleção, a qual teve como consequência a anergia de respostas DTH e exacerbação da infecção pulmonar com disseminação precoce para outros tecidos tanto em camundongos suscetíveis como resistentes (Cano *et al.*, 1998). Ademais, camundongos com o gene que codifica IFN- γ deletado são altamente suscetíveis a PCM (Souto *et al.*, 2000).

A fim de obter um melhor entendimento do fenômeno imunoregulatório associado com resistência e suscetibilidade na PCM experimental, células totais de linfonodos de camundongos resistentes (A/Sn) e suscetíveis (B10.A) à infecção por *P. brasiliensis* foram analisadas quanto à produção de citocinas do tipo 1 ou 2. Camundongos A/Sn tinham uma secreção inicial de altos níveis de IFN- γ , seguido por uma secreção sustentada de IL-2 e IFN- γ concomitante com IL-10. No começo da infecção citocinas tipo 2 não eram secretadas, enquanto

que TGF- β era em pequena quantidade. Na oitava semana após infecção ocorria a expressão de citocinas Th2, como IL-5, cuja produção era sustentada na fase crônica e IL-4 de forma transiente. Em camundongos B10.A foram detectados níveis mínimos e transitórios, ainda que inicial, de IFN- γ concomitante com produção relativamente alta de citocinas do tipo 2 IL-5 e IL-10 e a citocina regulatória TGF- β ; IL-4 foi detectada apenas de forma efêmera na fase mais tardia da infecção (Calich & Kashino, 1998; Kashino *et al.*, 2000). Dessa maneira, a secreção precoce de IL-5, IL-10 e TGF- β está associado à suscetibilidade, enquanto a produção de IL-2 e IFN- γ à resistência. O papel da IL-4 na PCM experimental foi posteriormente estudado utilizando camundongos deficientes na produção dessa citocina. Observou-se uma menor severidade da doença nos animais deficientes quando comparados com os normais, sugerindo um importante papel da IL-4 na determinação da suscetibilidade à infecção por *P. brasiliensis* (Pina *et al.*, 2004). No entanto, a IL-4 pode ter um papel paradoxal protegendo ou estimulando a doença em camundongos de linhagens diferentes, o que demonstra a importância do *background* genético na PCM experimental (Arruda *et al.*, 2004). Esse fato aliado aos resultados de Calich & Kashino, (1998) e Kashino *et al.*, (2000), onde houve uma ausência de produção inicial de IL-4 nos camundongos susceptíveis, mostram que o modelo Th1 e Th2 não explica todo o mecanismo de resistência e susceptibilidade na PCM. De forma semelhante, níveis de IL-4 em pacientes com candidíase mucocutânea crônica, apesar da produção não efetiva de citocinas do tipo 1, geralmente não apresentam-se aumentados (Lilic, 2002).

Na PCM humana ocorre uma relação entre padrão de citocinas e resistência similar àquela observada na infecção experimental. A avaliação da secreção de citocinas por PBMC de pacientes com as formas crônica (FC) e aguda (FA) da PCM e de indivíduos sadios sensibilizados para o fungo demonstrou uma produção substancial de IL-2, IFN- γ e IL-10 pelos indivíduos sadios, ao passo que os pacientes da FC e FA apresentavam baixos níveis de IL-2 e IFN- γ e níveis elevados de IL-10 (Bernard *et al.*, 2001). Marques-Mello *et al.* (2002) demonstraram que pacientes com FC localizada produziam menor quantidade de IL-4 e IL-5 e uma maior de IFN- γ em relação a pacientes com a FC disseminada. Ademais, Mamoni *et al.* (2002) observaram no soro de pacientes com a FA e FC multifocal um padrão de citocinas do tipo 2. Posteriormente Mamoni *et al.* (2006) ampliaram seus estudos por meio da avaliação, utilizando citometria de fluxo, da expressão intracelular de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-10, IL-12, e das quimiocinas CXCL8, CXCL9 e CXCL10 por PBMC estimuladas de pacientes com a FA e FC da doença, além de indivíduos sensibilizados para o fungo. Um perfil condizente com uma

resposta predominantemente Th1 foi encontrada nos indivíduos sensibilizados. Esse perfil era caracterizado por um número elevado de linfócitos T expressando IFN- γ , TNF- α , IL-2, CXCL9 e CXCL10 com baixos níveis dessas células positivas para IL-10. Apesar de uma polarização clara Th2 não ter sido evidenciada nos pacientes com a FA, uma baixa produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além de um grande número de células expressando IL-10 foram encontradas.

2.4. A interação fungo-macrófago e o parasitismo intracelular

Após a inalação, as primeiras células de defesa as quais conídios de *P. brasiliensis* encontram são os macrófagos alveolares residentes e DCs presentes no parênquima pulmonar. Esses conídios ou são fagocitados e convertem-se para a forma de levedura parasita, ou essa transição ocorre primeiro seguido pela fagocitose dessas leveduras (Cano *et al.*, 1992; Aristizabal, 1998; Gonzalez *et al.*, 2000). Os macrófagos residentes estão em maior número em relação às DCs (Twigg, 2004), o que os tornam mais provável de interagir inicialmente com o fungo após uma infecção primária. Apesar dos macrófagos possuírem a maquinaria requerida para a apresentação antigênica, sua maior contribuição para a defesa antifúngica é a fagocitose seguida da destruição desses organismos (Romani, 2004).

O primeiro processo da fagocitose é o reconhecimento dos microrganismos pelo macrófago utilizando as moléculas anteriormente descritas para as DCs, como os PRRs e CR3. O reconhecimento do *P. brasiliensis*, seja na sua forma de conídio ou levedura, parece ser mediado por mecanismos dependentes e independentes de opsonização (Calich *et al.*, 1979; Flávia-Popi *et al.*, 2002; de Mattos-Grosso *et al.*, 2003; Diniz *et al.*, 2004; Jiménez *et al.*, 2006). O conídio de *P. brasiliensis*, na presença de soro fresco de camundongo, possui componentes na parede celular capazes de ativar o complemento e gerar uma atividade opsonizadora via C3, já que a inativação do soro pelo calor ou seu tratamento com EDTA e a incubação de macrófagos com anticorpos anti-CR3 diminuem a fagocitose a índices similares aqueles de culturas de macrófagos com conídios não tratados com soro (Jiménez *et al.*, 2006). Um mecanismo independente da opsonização é representado pelo receptor de manose (MR). Esse receptor é uma lectina tipo C capaz de reconhecer resíduos de manose presentes em uma grande variedade de microrganismos (Linehan *et al.*, 2000), incluindo *P. brasiliensis* (Kanetsuna *et al.*, 1969; Carbonell *et al.*, 1970). Condizente com tal fato, o tratamento de culturas de macrófagos com D-

manose, D-fucose ou α -metil-manosida reduz a fagocitose de *P. brasiliensis* por essas células (Almeida *et al.*, 1998; Jiménez *et al.*, 2006). A gp43 parece ser um importante ligante do MR. Anticorpos policlonais para essa glicoproteína rica em manose proporcionam uma significativa redução na fagocitose de macrófagos desafiados com *P. brasiliensis* (Almeida *et al.*, 1998). Ademais, a gp43 também bloqueia a internalização de partículas de zymosan (preparado derivado da parede de *Saccharomyces cerevisiae* composto principalmente por manose e β -glicana), as quais são fagocitadas por macrófagos, em parte, via MR (Speert *et al.*, 1985; Flavia-Popi *et al.*, 2002). Um outro receptor, também uma lectina tipo C, envolvido no reconhecimento de *P. brasiliensis* por macrófagos é a dectina-1. Esse reconhecimento, porém, não ocorre diretamente, mas sim via opsonização por pentraxina 3, uma proteína inflamatória de fase aguda (Diniz *et al.*, 2004). A dectina-1 tem como ligante a β -glicana, um importante constituinte da parede celular de fungos, reconhecendo *S. cerevisiae*, *C. albicans*, e *Pneumocystis carinii* (Steele *et al.*, 2003; Herre *et al.*, 2004). A importância desse receptor foi recentemente avaliada em um modelo de candidíase sistêmica, onde camundongos com o gene para dectina-1 nocauteado eram mais susceptíveis a infecção (Taylor *et al.*, 2007). Esses camundongos apresentavam uma redução no recrutamento de leucócitos ao foco inflamatório, resultando em aumento da carga fúngica e disseminação. Estudos avaliando o reconhecimento de *P. brasiliensis* pelos receptores TLRs em macrófagos ainda não foram realizados, mas certamente esses receptores devem ser utilizados por essas células na interação inicial com o fungo, como tem sido descrito para *C. albicans*, *A. fumigatus* e *C. neoformans* (Bellocchio *et al.*, 2004; Biondo *et al.*, 2005).

Após o reconhecimento, os microrganismos são engolfados pela membrana plasmática do macrófago e internalizados ocorrendo a formação do fagossomo ou vacúolo fagocítico. O fagossomo logo após sua formação tem sua composição bioquímica semelhante à da membrana plasmática que lhe deu origem, sendo uma organela imatura incapaz de lidar com os microrganismos. A fim de se tornar microbicida, o fagossomo deve sofrer um processo de maturação conhecido como biogênese do fagolisossomo (Berón *et al.*, 1995; Desjardins, 1995). Após a formação, os fagossomos sofrem uma seqüência de fusões com endossomos precoces, endossomos maduros e lisossomos (Desjardins *et al.*, 1997). Essas interações gradualmente permitem que o fagossomo adquira propriedades dessas organelas e se transformem em fagolisossomos capazes de destruir patógenos intracelulares. Uma das características principais da biogênese do fagolisossomo é a progressiva diminuição do pH, que é 5,5 nos fagossomos recém formados e 4,5 quando fusionado com o lisossomo. Diversos são os mecanismos utilizados

pelos macrófagos para destruição de patógenos. Os mecanismos oxidativos e nitrosativos envolvem principalmente a atividade enzimática do complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase e a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), respectivamente (Babior, 2000; Nathan *et al.*, 2000; Missal *et al.*, 2004).

A NADPH oxidase é uma enzima ligada à membrana que catalisa a produção do ânion superóxido (O_2^-). Essa enzima não é ativada em macrófagos/neutrófilos em estado normal, porém a fagocitose de determinados microrganismos e certos polipeptídios inflamatórios ativa a NADPH oxidase a gerar O_2^- a partir da redução do oxigênio molecular. Essa enzima é composta por varias subunidades, incluindo uma flavocitocromo, conhecida como citocromo b_{558} . Nos fagócitos normais, essas subunidades estão distribuídas entre o citossol e as membranas de vesículas intracelulares, como endossomo e lisossomo. Quando o fagócito é estimulado, as subunidades citosólicas migram para as membranas onde se ligam às subunidades associadas às membranas a fim de promover a montagem da oxidase ativa (Heyworth *et al.*, 1991). As vesículas intracelulares então fusionam com a membrana do fagossomo resultando na descarga intracelular de O_2^- . A não atividade da NADPH oxidase resulta na doença granulomatosa crônica (DGC), uma condição severa em humanos que causa infecções bacterianas e fúngicas recorrentes (Goldblatt & Thrasher, 2000). Em modelos animais da DGC, camundongos são altamente susceptíveis a infecção por *Staphylococcus aureus* e *A. fumigatus* (Jackson *et al.*, 1995; Pollock *et al.*, 1995). Apesar de ter um efeito tóxico, o O_2^- não é o único reativo intermediário de oxigênio (RIO) importante na destruição de patógenos, pelo contrário essa molécula amplifica suas atividades por meio da formação de diversos novos RIOs mais deletérios. O superóxido é desmutado, espontânea ou enzimaticamente, para a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou combina-se com o óxido nítrico para formar o forte oxidante peroxinitrito ($ONOO^-$), o qual tem sido demonstrado como um importante fungicida (Vázquez-Torres *et al.*, 1996). Além disso, a interação do O_2^- e H_2O_2 com moléculas de ferro, via reações de Fenton, forma o radical hidroxila ($OH\cdot$), o mais citotóxico RIO (Cooke *et al.*, 2003; Missal *et al.*, 2004).

O óxido nítrico (NO, *nitric oxide*) é um radical livre, altamente reativo, lipofílico e extremamente lábil. Sua produção decorre da conversão de L-arginina em L-citrulina mediada pela iNOS por meio da oxidação do nitrogênio guanidínico da primeira, utilizando tetra-hidrobiopterina, flavina-adenina dinucleotídeo e flavina mononucleotídeo como co-fatores (Hibbs *et al.*, 1987; Michel *et al.*, 1997). A iNOS é expressa principalmente em macrófagos ativado por citocinas (IFN- γ , TNF- α e IL-1 β) e/ou por produtos microbianos (Xie *et al.*, 1992; Nathan,

1997). Modelos experimentais demonstram que a principal atividade microbicida dos macrófagos relaciona-se com a produção de NO e seus metabólitos, chamados coletivamente de reativos intermediários de nitrogênio (RIN), como o peróxonitrito que subsequente decompõe-se em moléculas adicionais também altamente reativas (Bogdan *et al.*, 2000; Missal *et al.*, 2004).

Ambos RIO e RIN têm efeitos pleiotrópicos nos microrganismos fagocitados, rapidamente reagindo com aminoácidos, lipídeos, DNA e íons metálicos (Nathan *et al.*, 2000; Cooke *et al.*, 2003; Missal *et al.*, 2004). Os RIOS oxidam todos os aminoácidos, porém o grupo tiol em cisteínas e metioninas são particularmente susceptíveis, o que frequentemente traz efeitos deletérios para a atividade ou regulação de diversas enzimas. Já a oxidação de resíduos de lisina pode ser particularmente danosa, uma vez que esse processo previne a ligação covalente da ubiquitina ao grupo amino da lisina, a qual é necessária para o direcionamento de proteínas danificadas para o proteossoma 26S (Berlett *et al.*, 1997). Assim, o acúmulo dessas proteínas resultaria em diversos efeitos negativos para as células de patógenos fagocitados. Especificamente, as enzimas mitocondriais como a aconitase são susceptíveis a inativação por meio da oxidação do centro ferro-enxofre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ mediada pelo superóxido, enquanto que o radical hidroxila atua no DNA produzindo diversas lesões, principalmente modificações de base, favorecendo altas taxas de mutações (Cooke *et al.*, 2003). O radical hidroxila ainda, em conjunto com o peróxido de hidrogênio, pode produzir dano celular por meio das reações de peroxidação lipídica das membranas mitocondriais, lisossômicas e plasmáticas, alterando suas estruturas e funções. A membrana mitocondrial, por exemplo, perde sua integridade e o gradiente eletroquímico de prótons transmembrana é parcial ou completamente dissipado sob a ação desses radicais (Sigler *et al.*, 1999). Considerando esse grande espectro de ação, os RIOS têm sido apontados como importantes fatores de proteção do hospedeiro contra diversas espécies fúngicas, como por exemplo, *C. albicans* (Djeu *et al.*, 1986; Stevenhagen & van Furth, 1993) e *A. fumigatus* (Roilides *et al.*, 1993; Gil-Lamaineri *et al.*, 2005). Entretanto, relatos controversos sobre a importância de O_2^- e H_2O_2 na destruição de *P. brasiliensis* dificultam nossa compreensão do papel dessas moléculas na PCM. Esse fungo é bastante resistente ao tratamento *in vitro* com altas concentrações de menadiona (um composto sintético que gera O_2^- intracelular) e H_2O_2 quando comparado com *C. albicans* (Schaffner *et al.*, 1986; Nascimento *et al.*, 2002; Dantas, 2005). Ademais, o efeito fungicida de macrófagos murinos alveolares e peritoneais ativados por citocinas independe da atividade oxidante de O_2^- e H_2O_2 (Brummer *et al.*, 1988a, b). Por outro

lado, neutrófilos humanos ativados exercem sua atividade por uma via dependente dessas moléculas oxidativas (Rodrigues *et al.*, 2007) e em monócitos, também ativados, a capacidade fungicida é relatada tanto como depende ou independente de H₂O₂ e O₂⁻ (Anjos *et al.*, 2002; Carmo *et al.*, 2006).

O efeito deletério dos RINs reside no fato dessas moléculas também causarem uma variedade de alterações no DNA incluindo quebras de fitas e desaminação. Além disso, nas proteínas causam modificações que envolvem nitrosilação de resíduos de cisteína e tirosina além de inativação de enzimas com centro ferro-enxofre (Fang *et al.*, 1997). Essas modificações podem afetar enzimas vitais como a do ciclo respiratório, causando efeitos microbiostático e microbicida *in vitro* e *in vivo* contra uma grande variedade de fungos, incluindo *P. brasiliensis* (Bocca *et al.*, 1998; Gonzalez *et al.* 2000, Nascimento *et al.*, 2002), *C. neoformans* (Lee *et al.*, 1994), *H. capsulatum* (Lane *et al.*, 1994), a forma de hifa de *C. albicans* (Blasi *et al.*, 1995), a forma de levedura de *P. marneffei* (Kudeken *et al.*, 1998), entre outros. Especificamente, uma ação deletéria do NO sobre *P. brasiliensis* foi observada não só *in vitro* como *in vivo*. Gonzalez *et al.* (2000), utilizando cultura de macrófagos murinos ativados por IFN- γ , demonstraram que a função fungicida e a inibição da transformação da forma de conídio para levedura eram dependentes da via L-arginina-óxido nítrico. Em trabalho anterior, Bocca *et al.* (1998) demonstraram um efeito fungicida do NO para leveduras de *P. brasiliensis in vitro*, sugerindo que a sua produção pelo hospedeiro poderia estar envolvida no controle da infecção. De fato, animais infectados e tratados com um inibidor da atividade da iNOS apresentavam um número significativamente maior de fungos no pulmão em comparação aos animais infectados não tratados. Ademais, Nascimento *et al.* (2002) confirmaram o papel fungicida do NO na PCM experimental por meio da utilização de camundongos geneticamente deficientes para o gene da iNOS.

Apesar do papel essencial do NO na destruição do *P. brasiliensis*, essa molécula quando produzida de forma acentuada e contínua está relacionada à imunossupressão e suscetibilidade na PCM. Bocca *et al.* 1998 e Souto *et al.* 2000 demonstraram que o NO inibe a linfoproliferação em resposta a mitógenos ou antígenos do fungo. Esse papel duplo do NO tem sido mostrado em outros modelos de infecção (Schwacha *et al.*, 1998; Wu-Hsieh *et al.*, 1998; MacFarlane *et al.*, 1999; Nabeshima *et al.*, 1999). Os mecanismos moleculares propostos para explicar como o NO interfere na proliferação dos linfócitos incluem: a apoptose de células apresentadoras de antígeno (macrófagos e células dendríticas) e linfócitos T (Albina *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1996; Tai *et al.*,

1997; Brito *et al.*, 1999), a supressão da expressão de IL-2 (Berendji *et al.*, 1999) e a inibição da expressão de CPH de classe II por macrófagos e células dendríticas (Sicher *et al.*, 1994) sendo que este último mecanismo parece atuar na PCM. Bocca *et al.* (1999) demonstraram que macrófagos peritoneais estimulados com IFN- γ obtidos de camundongos infectados com *P. brasiliensis* apresentavam uma reduzida capacidade de expressar CPH de classe II e linfoproliferação, entretanto esses parâmetros foram parcialmente revertidos em animais tratados com Nitro-Arg (inibidor da iNOS). Considerando que a ativação de linfócitos T CD4+ antígenos-específicos depende da apresentação antigênica via moléculas CPH de classe II, a imunossupressão observada ao longo da infecção induzida pelo *P. brasiliensis* pode ser, pelo menos em parte, atribuída à produção elevada de NO que inibe a expressão dessas moléculas.

Apesar dos efeitos citostáticos e citotóxicos de RIO e RIN, os microrganismos patogênicos devem subverter ou resistir à ação dessas moléculas por meio de diversas estratégias, sendo a detoxificação enzimática a mais bem compreendida (Nathan *et al.*, 2000; Missal *et al.*, 2004). A detoxificação por enzimas que convertem RIO em espécies menos tóxicas tem sido extensivamente documentada, principalmente, aquela mediada pelas enzimas superóxido desmutases (SODs), catalases e peroxidases. As SODs são um grupo de metaloenzimas altamente conservadas que detoxificam o O_2^- , degradando-o a oxigênio e peróxido de hidrogênio; o último é subsequentemente degradado por peroxidases e catalases (Rosen *et al.*, 1995). A remoção do O_2^- efetivamente bloqueia reações secundárias que levaria a formação de novos RIO e RIN tóxicos, como já descrito. As SODs, em eucariontes, podem estar complexadas com manganês ou cobre-zinco. A SOD Mn, localizada na matriz mitocondrial, tem sua importância na detoxificação do O_2^- gerado endogenamente como subproduto da respiração celular. Por outro lado, a localização no citoplasma, membrana ou parede celular da SOD Cu-Zn em fungos e no espaço periplasmático de algumas bactérias, sugere um papel dessa enzima na proteção contra O_2^- derivado de fagócitos (Nathan *et al.*, 2000; Missal *et al.*, 2004). E de fato, a SOD Cu-Zn tem sido demonstrada como um importante fator de virulência em diversos modelos de infecção fúngicas e bacterianas (Farrant *et al.*, 1997; Wilks *et al.*, 1998; Battistoni *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 2002; Cox *et al.*, 2003). A fim de elucidar o papel da SOD Cu-Zn na virulência de *C. albicans*, seu respectivo gene (*sod1*), foi nocauteado (Hwang *et al.*, 2002). Os mutantes nulos apresentavam-se mais sensíveis ao tratamento *in vitro* com menadiona, mas não a peróxido de hidrogênio. Além disso, a sobrevivência intracelular em macrófagos foi reprimida. De forma interessante, esses mutantes quando tratados com doses sub-letais de menadiona

apresentavam uma resposta adaptativa comparada com a de *C. albicans* tipo selvagem. Dessa maneira, outras enzimas anti-oxidantes, além daquela codificada por *sod1*, estariam envolvidas na resposta contra os radicais superóxidos nesse fungo. De fato, três outras SOD Cu-Zn, SOD4, SOD5 e SOD6 foram identificadas em *C. albicans* e pelo menos uma delas, a SOD5, é requerida para a virulência em um modelo murino de infecção (Martchenko *et al.*, 2004). De forma semelhante, o nocaute do gene *sod1* em *C. neoformans* causou uma menor habilidade desse fungo em sobreviver e replicar intracelularmente em macrófagos murinos e humanos, além de atenuar a sua virulência *in vivo* (Cox *et al.*, 2003).

A detoxificação do H₂O₂ é conferida principalmente pelas peroxidases e catalases. As catalases, assim como as SODs, são metaloenzimas que promovem a conversão do H₂O₂ em água e oxigênio molecular. O papel da catalase, codificada pelo gene *ctal*, na virulência de *C. albicans* foi avaliado em um modelo murino de candidíase sistêmica. Os mutantes nulos para *ctal* apresentavam uma menor capacidade de sobreviver em modelo murino de infecção e uma aumentada susceptibilidade a temperaturas elevadas e detergentes. Ademais, eram mais sensíveis aos danos causados por neutrófilos humanos (Wysong *et al.*, 1998; Nakagawa *et al.*, 2004). O papel das catalases na virulência de *A. fumigatus* não parece ser tão importante como demonstrado para *C. albicans*. A deleção de três genes codificando diferentes catalases, uma expressa na forma de conídio e as outras duas na de micélio, resultou em mutantes sem atividade de catalase. Porém esses mutantes tinham apenas um pequeno aumento na suscetibilidade para o tratamento *in vitro* com peróxido e eram tão suscetíveis quanto os isolados do tipo selvagem à destruição por macrófagos (Chang *et al.*, 1998; Paris *et al.*, 2003).

Diversas enzimas envolvidas na detoxificação de RIN têm sido identificadas, principalmente em bactérias, e incluem flavohemoglobinas, NO redutase, S-nitrosoglutathione redutase e peroxinitrito redutase (Bryk *et al.*, 2000; Poole & Hughes, 2000). Evidências demonstrando o envolvimento dessas enzimas na patogênese bacteriana e/ou fúngica ainda são esperadas. Entretanto, a flavohemoglobulina promove a sobrevivência de *Salmonella enterica* no interior de macrófagos produtores de NO (Stevanin *et al.*, 2002) e juntamente com a S-nitrosoglutathione redutase atua como fator de virulência em *C. neoformans* (de Jesús-Berríos *et al.*, 2003).

Além do estresse oxidativo/nitrosativo imposto pelo macrófago aos microrganismos internalizados, o microambiente desses fagócitos tem sido associado a uma baixa disponibilidade de nutrientes como ferro, aminoácidos e glicose. Ademais, peptídeos antimicrobianos, proteases

e outras enzimas hidrolíticas também estão presentes (Amer *et al.*, 2002; Lorenz & Fink, 2002; Romani, 2004; Schaible & Kaufmann, 2004).

O ferro é essencial para maioria dos organismos, uma vez que esse metal atua como co-fator ou grupo prostético de diversas enzimas envolvidas em várias funções celulares e vias metabólicas. Nos microrganismos patogênicos a aquisição de ferro é considerada essencial no processo de infecção, já que esse metal está normalmente seqüestrado no hospedeiro por proteínas de alta-afinidade para ferro como a transferrina e lactoferrina (Schaible & Kaufmann, 2004). Dessa maneira, diversas estratégias foram adquiridas por patógenos a fim de obter ferro no ambiente do hospedeiro como, por exemplo, sua extração da transferrina ou a secreção de sideróforos (moléculas de pequena massa molecular quelantes de ferro extracelular). Em resposta a um ambiente depletado de ferro, fungos patogênicos como *C. neoformans*, *H. capsulatum*, *C. albicans* e *A. fumigatus* secretam sideróforos (Hass, 2003). Apesar de ainda não ter sido totalmente caracterizado em *P. brasiliensis* um mecanismo de obtenção de ferro do hospedeiro, esse metal é essencial não só para o dimorfismo, mas também para sobrevivência intracelular do fungo em monócitos humanos (Cano *et al.*, 1994; Dias-Melicio *et al.*, 2006). Ademais, o tratamento *in vivo* com cloroquina, uma droga que inibe a liberação de ferro da transferrina, significativamente diminuiu a carga fúngica dos pulmões de camundongos infectados por *P. brasiliensis* (Dias-Melicio *et al.*, 2006).

A baixa disponibilidade de compostos ricos em carbono, como a glicose, no ambiente do macrófago é um importante obstáculo para a sobrevivência de microrganismos intracelulares (Finlay & Falkow, 1997; Lorenz & Fink, 2002). Esse carboidrato é a principal fonte de carbono da maioria dos organismos, podendo ser convertida em ribose e desoxirribose por meio da via das pentoses e catabolizada para acetil-CoA via glicólise. O acetil-CoA pode entrar no ciclo do ácido cítrico (TCA, *citric acid cycle*), onde oito passos enzimáticos o converte em intermediários que alimentam diversas vias metabólicas, incluindo aquelas de aminoácidos, ácidos graxos e glicose. Os patógenos intracelulares devem ter acesso preferencialmente a compostos de dois carbonos (C₂), como o acetato (produto da degradação de ácidos graxos), para produção de energia. A utilização desses compostos C₂, ao contrário da glicose, seria inútil devido aos dois passos de descarboxilação presentes no TCA. Porém, fungos e bactérias adquiriram ao longo da evolução um caminho alternativo ou desvio que evita os passos de descarboxilação; o chamado ciclo do glioxilato (Kornberg, 1966; Lorenz & Fink, 2002). Dessa maneira, esse ciclo permite a assimilação de compostos C₂ no TCA para a gliconeogênese. Duas enzimas, a isocitrato liase

(ICL) e malato sintase (MLS) têm suas atividades limitadas e são específicas e a esse ciclo. Os patógenos humanos *M. tuberculosis* e *C. albicans* respondem à fagocitose induzindo a expressão de *icl1* e *mls* quando comparado com os microrganismos cultivados *in vitro* (Graham *et al.*, 1999; Lorenz & Fink, 2002; Schnappinger *et al.*, 2003; Lorenz *et al.*, 2004). Ademais, *icl1* também teve sua expressão induzida em pulmões de camundongos cronicamente infectados com *M. tuberculosis*, sugerindo um importante papel do ciclo do glioxilato na habilidade dessa bactéria causar doença (Timm *et al.*, 2003). Em modelo murino de candidíase sistêmica, isolados de *C. albicans* com o gene *icl1* nocauteado teve sua virulência extremamente reduzida; todos os camundongos infectados com o isolado do tipo-selvagem morreram após 3 dias de infecção enquanto que 7 de 10 daqueles infectados com os mutantes para *icl1* sobreviveram por mais de 28 dias (Lorenz & Fink, 2001). Evidências complementares sobre a contribuição do ciclo do glioxilato no potencial de virulência de *C. albicans* foram demonstradas por Fradin *et al.*, (2003). Usando um microarranjo genômico, esses autores avaliaram o perfil transcricional desse fungo em resposta ao sangue humano. Entre os diversos genes diferencialmente expressos encontravam-se aqueles que codificam para a isocitrato liase e malato sintase, sugerindo que o ciclo do glioxilato deve ser requerido para adaptação e sobrevivência na corrente sanguínea, um passo essencial para o estabelecimento da candidíase sistêmica. Apesar da descrita importância do ciclo do glioxilato na virulência de *M. tuberculosis* e *C. albicans*, o mesmo não parece ocorrer em *C. neoformans*. Em um modelo experimental de meningite em coelhos causada por *C. neoformans*, *icl1* teve sua expressão induzida na primeira semana de infecção, sugerindo que a enzima codificada por esse gene e o ciclo do glioxilato seriam importantes para obtenção de energia *in vivo* por esse fungo. Entretanto, mutantes com *icl1* nocauteado não apresentavam diferenças na taxa de crescimento em macrófagos ou diminuição na virulência em dois modelos animais de infecção (Rude *et al.*, 2002). Dessa maneira, apesar de responder ao ambiente depletado de glicose do hospedeiro acionando o ciclo do glioxilato, esse parece não ser essencial para a progressão da doença causada por *C. neoformans*.

Como observamos, apesar do arsenal microbicida, diversos patógenos apresentam várias estratégias ou fatores de virulência usados para escapar da destruição e sobreviver no interior dos macrófagos como parasitas intracelulares dessas células (Woods, 2003; Del Poeta, 2004; Fan *et al.*, 2005). Alguns patógenos intracelulares como *C. neoformans* e *H. capsulatum* recebem a denominação de facultativos, pois são organismos de vida livre que não necessitam de células do hospedeiro para replicação e sobrevivência (Feldmesser *et al.*, 2000).

Evidências, diretas e indiretas, indicam que *P. brasiliensis* também seja um patógeno intracelular facultativo. As diretas estão relacionadas às análises de co-culturas de macrófagos com esse fungo e de tecidos infectados por meio de microscopia óptica e eletrônica (Furtado *et al.*, 1967; Brummer *et al.*, 1989; 1990; Moscardi-Bacchi *et al.*, 1994). Por outro lado, a resposta típica granulomatosa composta principalmente por macrófagos e linfócitos é indicativa de uma resposta inflamatória montada contra patógenos intracelulares (Raupach & Kaufmann, 2001; Sandor *et al.*, 2003). Brummer *et al.* (1989) demonstraram, utilizando três diferentes isolados de *P. brasiliensis*, que uma vez internalizado esse fungo não é destruído. Pelo contrário, sobrevive e multiplica-se no interior de macrófagos murinos alveolares e peritoneais não ativados por IFN- γ recombinante ou sobrenadante de esplenócitos tratados com concanavalina-A. A multiplicação intracelular de *P. brasiliensis* foi determinada por microscopia óptica (observação de leveduras em brotamento) e pela contagem da UFC durante vários tempos de co-cultura com os diferentes macrófagos, de tal maneira que após 72 horas a multiplicação fúngica aumentou 19 e 4 vezes em macrófagos peritoneais e alveolares, respectivamente. Em contraste, quando ativados os macrófagos foram altamente fungicidas (reduzindo os valores de UFC em 64%) para as leveduras de *P. brasiliensis* internalizadas, como já tinha sido demonstrado anteriormente em estudos utilizando tempos menores de co-cultura (no máximo 4 horas) (Brummer *et al.*, 1988a, b). Condizente com esses resultados, o único estudo ultraestrutural realizado para a análise da interação *P. brasiliensis*-macrófagos revelou que 24 horas após a internalização por macrófagos murinos não ativados, diversas leveduras em brotamento eram aparentes no interior dos fagossomos (Brummer *et al.*, 1990). Essas leveduras apresentavam estruturas celulares típicas, similares àquelas observadas em outros estudos ultraestruturais de *P. brasiliensis* em tecido ou cultivado *in vitro* (Furtado *et al.*, 1967; Kashino *et al.*, 1987). Em contraste, 4 horas após a fagocitose por macrófagos ativados as leveduras apresentavam estruturas mitocondriais anormais seguidas da formação de diversos vacúolos vazios, desintegração do citoplasma e finalmente formação de células fantasma com parede celular intactas.

Macrófagos derivados de monócitos e monócitos humanos também são permissivos à replicação intracelular de *P. brasiliensis*, porém apenas uma atividade fungistática e não fungicida foi demonstrada quando esses fagócitos eram ativados com IFN- γ recombinante (Moscardi-Bacchi *et al.*, 1994). Posteriormente, Calvi *et al.* (2003) revelaram que o efeito fungicida efetivo de monócitos humanos contra o *P. brasiliensis* depende do contato prévio *in vivo* com o fungo e da virulência do isolado utilizado. Quando desafiados com o isolado Pb18

(alta virulência), monócitos de pacientes da PCM tratados com IFN- γ inibiam a replicação intracelular do fungo. Por outro lado, monócitos derivados de doadores saudáveis, mesmo ativados, não continham o crescimento intracelular do fungo. De forma interessante, quando desafiados com o isolado de baixa virulência (Pb265), tanto monócitos ativados de pacientes como os de indivíduos normais exibiam atividade fungicida. Este fato foi relacionado a uma maior presença de TNF- α no sobrenadante de culturas com o Pb265. A importância do TNF- α na ativação de monócitos humanos foi recentemente corroborada pelo estudo de Carmo *et al.* (2006), onde demonstraram que essas células tratadas apenas com TNF- α recombinante, apresentam atividade fungicida ao isolado Pb18. Em conjunto, esses dados sugerem que, assim como na infecção pelo *H. capsulatum* e *C. neoformans*, o macrófago não ativado não só fornece um ambiente favorável à multiplicação fúngica, mas também um mecanismo de transporte para células de *P. brasiliensis* fagocitadas, via corrente sanguínea ou linfa. Assim, os macrófagos podem representar um papel importante na disseminação do fungo pelo organismo a partir do foco primário de infecção. Ademais, a presença no interior dos macrófagos pode conferir ao fungo proteção aos mecanismos de defesa inata, como o sistema complemento, anticorpos e fatores imunes alveolares ou ainda contra drogas anti-fúngicas o que propiciaria a latência característica da PCM (Woods, 2002; Del Poeta, 2004).

Condizente com o descrito para macrófagos, os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) não ativados também são permissivos à replicação intracelular do *P. brasiliensis*. Schaffner *et al.* (1986) propuseram que a diferença básica entre os fungos patogênicos primários (*C. immitis*, *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* e *S. shenkii*) e os oportunistas (*C. albicans*, *Aspergillus* spp., e *T. capitatum*) estaria relacionado à resistência natural dos primeiros à destruição por neutrófilos humanos. Esse relato está de acordo com o fato dos neutrófilos serem essenciais na defesa contra *C. albicans* e *A. fumigatus*, já que a neutropenia determina um grande fator de risco na aquisição da infecção e desenvolvimento da doença causada por esses patógenos (Rolston *et al.*, 2004). Posteriormente estudos utilizando neutrófilos murinos demonstraram uma correlação entre a atividade anti-fúngica dessas células com o status de ativação, de tal maneira que somente neutrófilos de camundongos sensibilizados com *P. brasiliensis* exibiam uma eficiente atividade fungicida *in vitro* (McEwen *et al.*, 1987). Ademais, Kurita *et al.* (1999a) mostraram que neutrófilos elicitados com caseína exibiam um efeito fungistático para leveduras de *P. brasiliensis* e que IFN- γ induzia um efeito fungicida contra esse fungo. Resultados similares foram obtidos quando neutrófilos humanos foram ativados com IFN-

γ , IL-1 e fator estimulador das colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, *granulocyte/macrophage colony stimulating factors*) (Kurita *et al.*, 2000), o mesmo não acontecendo quando essas células eram tratadas com TNF- α e IL-8 (Kurita *et al.*, 1999b). Recentemente, Rodrigues *et al.* (2007) corroboraram esses estudos ao mostrar que neutrófilos humanos não ativados falham em conter a replicação intracelular de *P. brasiliensis*. Porém, essa capacidade é resgatada quando essas células são tratadas com IFN- γ , TNF- α e GM-CSF. Dessa maneira, assim como demonstrado para macrófagos, a atividade microbicida ótima dessas células contra o *P. brasiliensis* só são reveladas diante da ativação por citocinas.

Recentemente, novas informações foram geradas contribuindo para o nosso conhecimento sobre a interação *P. brasiliensis*-macrófago. A principal molécula imunogênica do *P. brasiliensis*, a gp43, quando adicionada de forma exógena apresenta um efeito inibitório em diversas funções de macrófagos murinos peritoneais, tais como a fagocitose (via receptor de manose), produção de radicais livres e atividade microbicida (Flavia-Popi *et al.*, 2002). Especificamente, a produção espontânea ou induzida por zymosan de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio foi reduzida nos macrófagos infectados derivados de camundongos resistentes e susceptíveis ao *P. brasiliensis*. Uma outra glicoproteína desse fungo, a gp70, também exerce efeitos inibitórios bastante semelhantes nos macrófagos murinos (de Mattos-Grosso *et al.*, 2003). Nesse contexto, essas glicoproteínas poderiam atuar como um mecanismo de escape para o estabelecimento da infecção pelo *P. brasiliensis*. Pelo menos para a gp70 essa proposição parece correta, já que a imunização passiva com anticorpos monoclonais neutralizantes para essa proteína reduz significativamente a carga fúngica (UFC) e formação de granulomas nos pulmões de camundongos infectados. Uma outra molécula que tem uma ação inibitória nas funções efetoras dos macrófagos é a prostaglandina E₂ (PGE₂). Além da sua produção por células do hospedeiro ser induzida pela infecção por *P. brasiliensis*, o próprio fungo também pode produzir PGE₂ (Bordon *et al.*, 2007a,b). Prostaglandinas são eicosanóides sintetizados a partir do ácido aracdônico por uma via metabólica dependente da enzima cicloxigenase. Essas moléculas lipídicas regulam diversos aspectos da resposta imunológica como a indução de uma resposta Th2 em detrimento de uma Th1, além de inibirem a proliferação de linfócitos e a produção de quimiocinas (Kunkel *et al.*, 1988; Betz *et al.*, 1991; Harris *et al.*, 2002). Na PCM experimental, esplenócitos secretam PGE₂ inibindo a produção de IL-2 e aumentando os níveis de IL4 e IL-10 (Michelin *et al.*, 2002). Outro estudo mostra que monócitos humanos não matam o isolado altamente virulento Pb18. Porém, o tratamento das culturas com indometacina expôs uma

importante atividade fungicida, sugerindo um papel da PGE₂ no processo inibitório (Bordon *et al.*, 2007b). Condizente com os achados para outros patógenos intracelulares (Venkataprasad *et al.*, 1996), Bordon *et al.*, 2007a relacionaram a baixa atividade fungicida com a reduzida produção de TNF- α e H₂O₂ promovida pela ação da PGE₂. *C. neoformans* e *C. albicans* também produzem prostaglandinas, cujas ações em macrófagos murinos são similares àquelas realizadas por prostaglandinas de mamíferos (Noverr *et al.*, 2001). Apesar de não ter sido avaliado o efeito da PGE₂ de *P. brasiliensis* em macrófagos, a sua produção por diferentes isolados *in vitro* sugere um papel dessa molécula na capacidade do fungo em causar doença (Bordon *et al.*, 2007a).

Diante do exposto até aqui, fica claro que a interação entre *P. brasiliensis* e macrófagos é bastante complexa e representa um determinante primário no desenvolvimento da infecção, podendo resultar na proliferação do fungo em hospedeiros suscetíveis, em sua latência ou erradicação.

2.5. O fungo *P. brasiliensis* na era da genômica funcional

Uma característica fundamental do *P. brasiliensis* é a sua habilidade de alterar sua forma de micélio saprófita em levedura parasita no hospedeiro. Cada forma apresenta um papel crítico na infecção e doença, porém pouco é conhecido sobre as diferenças moleculares entre as formas e o que regula a transição entre elas. Nesse contexto, a fim de identificar genes cuja regulação é dependente do tipo celular nosso laboratório estuda há vários anos genes diferencialmente expressos durante o dimorfismo de *P. brasiliensis*. Diversos genes com a expressão induzida na levedura foram identificados como, por exemplo, aqueles que codificam para HSP70, HSP60, manosiltransferase, catalase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, PbY20, malato desidrogenase, frutose bifosfato aldolase e triose-fosfato isomerase (Silva *et al.*, 1999; Salem-Izacc *et al.*, 2001; Barbosa *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2004). Outros estudos usando a técnica de *Differential Display Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (DDRT-PCR) identificaram genes diferencialmente expressos em ambas as formas do fungo (Venâncio *et al.*, 2002; Albuquerque *et al.*, 2004). Apesar de precisas, as análises convencionais de expressão gênica utilizadas nos trabalhos citados não apresentam a eficiência e rapidez necessária para acompanhar o ritmo de sequenciamentos em larga escala e a descoberta de novos genes. Dessa maneira, a fim de se obter uma descrição molecular mais rápida e abrangente das duas fases morfológicas do fungo, o Projeto Genoma Funcional e Diferencial de *P. brasiliensis*

(MCT/CNPq) foi desenvolvido em nosso laboratório junto à 11 instituições da região Centro-Oeste do Brasil (Felipe *et al.*, 2003; 2005).

O objetivo principal desse projeto foi construir uma biblioteca de DNA complementar (cDNA) seguido de seu sequenciamento a partir da região 5' (mais informativa e conservada) gerando rapidamente um número elevado de seqüências parciais de genes expressos nas formas miceliana e leveduriforme de *P. brasiliensis* cultivado *in vitro*. Essas seqüências são denominadas de etiquetas de seqüências expressas ou ESTs (*Expressed Sequence Tags*). Foram geradas um total de 20225 ESTs, sendo 16351 agrupadas em 2655 *contigs* e o restante descrito como *singlets* ou seqüências únicas, constituindo um total de 6022 PbAEST (*P. brasiliensis Assembled Expressed Sequence Tags*). Do total de PbAESTs obtidas, 69,4% mostraram similaridade com seqüências já descritas de outros organismos. Os dados obtidos por esse projeto permitiram a identificação de genes envolvidos em diversos processos biológicos de potencial relevância para um melhor entendimento da relação patógeno-hospedeiro. Nesse contexto, foram encontrados 30 genes ortólogos a genes descritos previamente como sendo fatores de virulência de outros organismos patogênicos, segundo o postulado de molecular de Koch (Falkow, 2004; Tavares *et al.*, 2005). Dentre estes, destacam-se genes relacionados ao metabolismo, síntese de parede celular e detoxificação de RIO e RIN, além de outros potenciais determinantes de virulência (Felipe *et al.*, 2005; Tavares *et al.*, 2005). A partir da biblioteca de cDNA obtida no citado projeto foi possível construir arranjos de cDNA (microarranjo), os quais permitem a análise da expressão de centenas ou milhares de genes em um único experimento (Felipe *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2006).

A tecnologia do microarranjo é baseado no princípio da hibridação massiva de populações de cDNA com oligonucleotídeos ou cDNAs imobilizados. O RNA total de um determinado tipo celular em diferentes condições ou diferentes tipos celulares é isolado por métodos padrões e o cDNA preparado e marcado com fluoróforos (Cy3 e Cy5) ou isótopos radioativos (³³P). Esse processo fornece uma mistura marcada de cDNAs (sonda complexa) o qual reflete a distribuição de mRNA inicial relativo àquela condição em particular. A sonda complexa é então hibridada com uma coleção de fragmentos de cDNA ou oligonucleotídeos, representando diferentes genes, covalentemente imobilizados em um suporte sólido. Essa coleção é distribuída em um arranjo ordenado, criando uma matriz de pontos (*spots*) identificados pelo seu endereço na matriz. Lâminas de vidro ou membranas de náilon são os suportes sólidos mais comuns, apresentando níveis comparáveis de sensibilidade e densidade de

arranjo (número de *spots*). Entretanto, os microarranjos de náilon fornecem algumas vantagens em relação aos de vidro, pois são mais baratos considerando o custo por arranjo e o equipamento necessário para analisá-los após a hibridação com a sonda complexa. Além disso, os arranjos de náilon podem ser convenientemente montados *in house* a fim de conter os genes desejados para a análise. Após hibridação e lavagem, o microarranjo é escaneado e o sinal de hibridação de cada *spot* adquirido e quantificado a fim determinar o nível relativo de expressão dos genes entre as condições estudadas. Porém, antes de qualquer informação biológica poder ser extraída, os dados brutos devem ser filtrados e normalizados (Cox, 2001; **Chuaqui** *et al.*, 2002; Stoughton, 2005; Jares, 2006).

O uso da tecnologia de microarranjos vem revolucionando o estudo da interação patógeno-hospedeiro (Diehn *et al.*, 2001; Jenner & Young, 2005; Hossain *et al.*, 2006). Especificamente, no estudo da relação patógeno intracelular-macróforo o microarranjo vem permitindo um maior entendimento de como esses patógenos se adaptam e sobrevivem no interior desses fagócitos. Schnappinger *et al.* (2003) analisaram a resposta transcricional de *M. tuberculosis* ao fagossomo de macróforos murinos ativados ou não por IFN- γ . Esse trabalho demonstra que o bacilo percebe o fagossomo desses macróforos expressando diferencialmente 601 genes quando comparado com o bacilo crescido *in vitro*. A indução de vias requeridas para o metabolismo de ácido graxo e o ciclo do glioxilato indicaram um ambiente fagossomal pobre em glicose. Além disso, genes relacionados à aquisição de ferro, detoxificação de moléculas oxidativas e nitrosativas, síntese e modificação de DNA e componentes da parede também foram induzidos. Essas alterações provavelmente refletem a adaptação da bactéria às condições do fagossomo. Porém, a modulação de outros genes pode estar envolvida na conhecida modificação da maturação dessa organela em benefício próprio do bacilo (Honer zu Bentrop & Russell, 2001). Em fungos, o patógeno oportunista *C. albicans* revela uma dramática reprogramação transcricional, que ocorre em dois passos consecutivos, em resposta a fagocitose por macróforos murinos (Lorenz *et al.*, 2004). Em uma fase inicial as leveduras de *C. albicans* regulam genes importantes para a sobrevivência em um ambiente pobre em nutrientes, tais como aqueles relacionados ao metabolismo gliconeogênico, ativação da degradação de ácidos graxos e biosíntese de aminoácidos. Já em uma fase mais tardia, quando a transformação para hifa permite a *C. albicans* escapar dos macróforos, o metabolismo glicolítico é usado. Além disso, há uma grande resposta não metabólica envolvida na fase inicial, incluindo a indução de genes relacionados ao reparo de DNA, detoxificação de estresse oxidativo e sistema de obtenção de

peptídeos. Muitos dos genes diferencialmente expressos por *C. albicans* quando na interação com os macrófagos murinos, foram observados também para *C. neoformans* fagocitados por macrófagos da linhagem J774 (Fan *et al.*, 2005). O fato de que a adaptação transcricional observada nos fungos patogênicos citados acima é em sua quase totalidade ausente no fungo não patogênico *S. cerevisiae* quando interagindo com macrófagos sugere que as mudanças observadas devem contribuir significativamente na habilidade de *C. albicans* e *C. neoformans* sobreviverem e causarem doença *in vivo*. Nesse contexto, as condições danosas do interior dos macrófagos devem elicitar novos programas de expressão gênica no *P. brasiliensis* fagocitado, sendo que seu estudo pode fornecer importantes dados de como esse fungo lida com os sinais recebidos do hospedeiro e também quais nutrientes estão disponíveis durante a infecção. Ademais, uma vez que estudos com outros patógenos têm demonstrado que aqueles genes modulados durante a infecção de macrófagos são frequentemente importantes para virulência, nós podemos vislumbrar o mesmo com tais estudos realizados com *P. brasiliensis*.

3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Apesar da importância da interação *P. brasiliensis*-macrófago, pouco é conhecido sobre a biologia desse fungo quando na interface com seu hospedeiro, o que muito limita a compreensão da patogênese da PCM. A habilidade do fungo em sobreviver e se multiplicar nos macrófagos por meio de mecanismos específicos que efetivamente impedem a capacidade fungicida natural desses fagócitos deve fornecer a base para a latência e disseminação do *P. brasiliensis* no hospedeiro humano. A fim de avaliarmos esses mecanismos, propomos a hipótese a qual o *P. brasiliensis* deve modular genes cujos produtos permitem a adaptação aos vários estresses do microambiente do macrófago, tais como a baixa disponibilidade de nutrientes, acidificação do meio, choque osmótico e moléculas microbicidas (radicais de oxigênio e nitrogênio). A fim de avaliarmos tal hipótese utilizamos um microarranjo de DNA constituído de 1152 clones de cDNA derivados do projeto transcriptoma de *P. brasiliensis* (Felipe *et al.*, 2005)

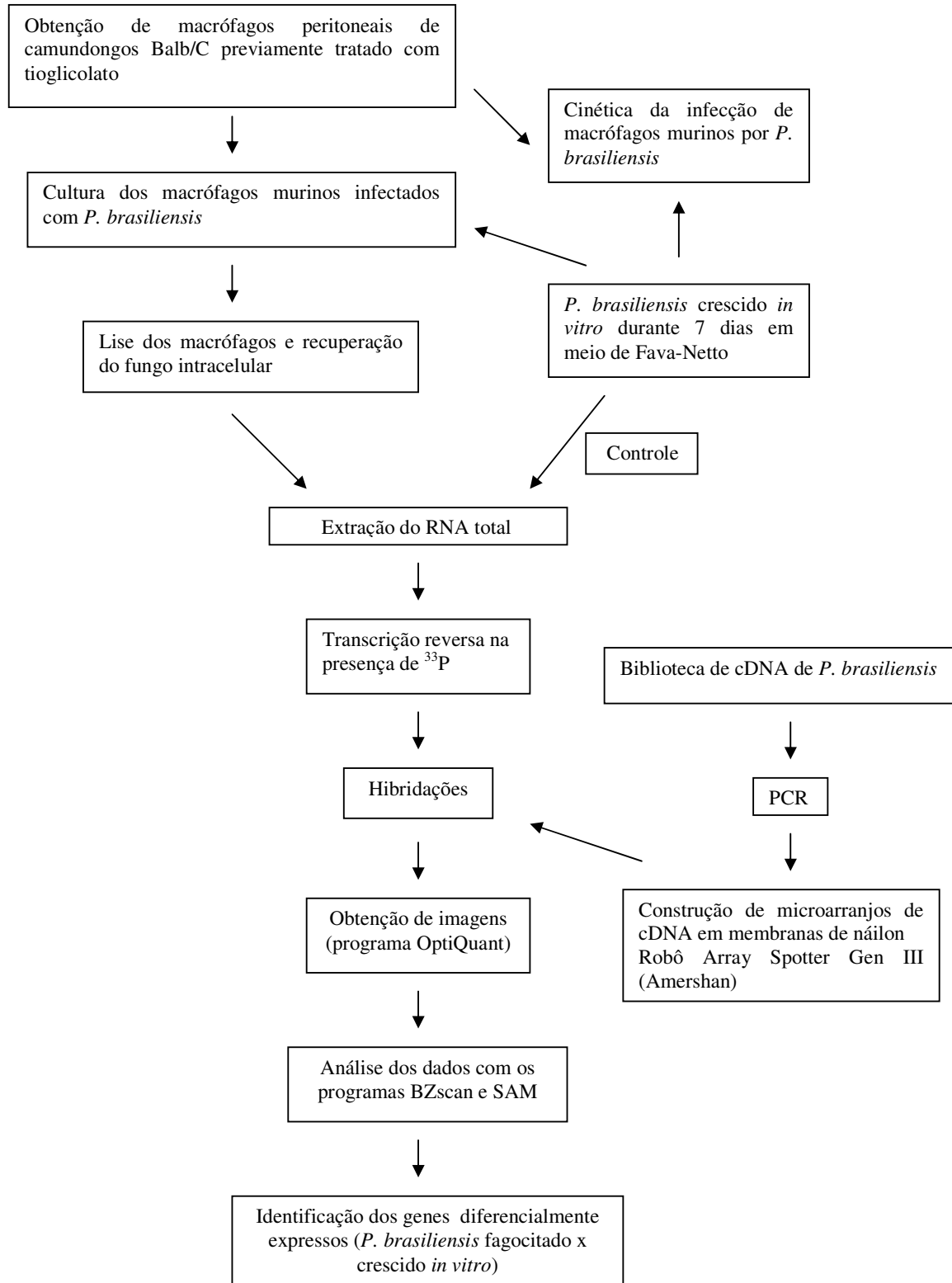
A identificação de genes de *P. brasiliensis* diferencialmente expressos no interior do macrófago abre um novo aspecto no estudo da patogênese da PCM, podendo fornecer genes candidatos para estudos de virulência e potenciais novos alvos para drogas.

4. OBJETIVO

Analisar o perfil transcricional do fungo *P. brasiliensis* quando na interação com macrófagos peritoneais murinos, utilizando como controle o fungo crescido *in vitro*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental



5.1. Isolado fúngico e condições de cultura

O isolado Pb01 (ATCC- MYA-826) de *P. brasiliensis*, na forma de levedura, foi cultivado em meio Fava-Netto semi-sólido (protease peptona 0,3%, peptona 1%, extrato de carne 0,5%, dextrose 4%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5% e ágar 1,6 % pH 7,2) por 7 dias a 37°C a fim de ser utilizado tanto nos experimentos de infecção *ex vivo* de macrófagos ou como controle.

5.2. Isolamento e cultivo de macrófagos peritoneais murinos

Camundongos da linhagem isogênica Balb/c, apresentando 6 a 8 semanas de idade, foram injetados na cavidade peritoneal com 2 mL de tioglicolato 3% (BioBrás, Brasil). Após 72 h, os animais foram sacrificados e suas células recuperadas por meio de lavagem peritoneal utilizando o meio de cultura de células RPMI-1640 (Sigma Chemical, USA) gelado e suplementado com HEPES 20 mM, bicarbonato de sódio 1,5g/L, gentamicina 25 µg/mL e heparina 10 U/mL. As células peritoneais foram recuperadas por centrifugação a $300 \times g$ por 5 min, lavadas e ressuspensas. O número de células viáveis foi determinado pelo método de exclusão do corante Azul de Tripán. As células foram então depositadas sobre lamínulas estéreis presentes nos poços de microplacas (24 wells) (5×10^5 /poço) ou em frascos de cultura de células de 150 cm² (2×10^7 células/frasco) e incubadas a 37 °C por 1 h. Após incubação, as células não aderidas foram removidas por lavagens consecutivas com tampão fosfato pré-aquecido e as que permaneceram aderidas foram incubadas em RPMI suplementado como descrito acima (exceto heparina), com a adição de soro fetal bovino 10 % (Gibco BRL, USA), a 37 °C em atmosfera de ar umidificada contendo 5% de CO₂ por 16 h. As co-culturas em microplacas foram utilizadas para avaliar a cinética da fagocitose de *P. brasiliensis* (ver item 5.4), enquanto que as co-culturas em frascos foram utilizadas para obtenção do RNA total do fungo fagocitado a fim de ser utilizado nos experimentos de análise da expressão gênica.

5.3. Infecção *ex vivo* de macrófagos murinos com leveduras de *P. brasiliensis*

Leveduras de *P. brasiliensis* foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com HEPES 20 mM e bicarbonato de sódio 1,5g/L contendo 20% de soro fresco de camundongos Balb/c. O protocolo de opsonização seguiu por meio da incubação da suspensão de leveduras a 37°C por 30 min. As culturas de macrófagos presentes nas microplacas foram infectadas com 1×10^5 , enquanto que os macrófagos nos frasco de cultura foram infectados com 4×10^6 leveduras. Em ambos os casos, a proporção levedura-macrófago foi de 1:5. As co-culturas foram então incubadas a 37°C em atmosfera de ar umidificada contendo 5% de CO₂.

5.4. Análise da cinética da internalização de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos murinos

Após 1, 3, 6 e 12 h de infecção, as lamínulas eram removidas e lavadas com meio RPMI pré-aquecido a 37 °C a fim de retirar as leveduras extracelulares ou fracamente aderidas aos macrófagos. As lamínulas contendo a co-cultura eram então fixadas com metanol e coradas com Wright-Giemsa. Utilizando microscopia óptica (magnitude de 1000×), cinquenta a cem leveduras de *P. brasiliensis* foram contadas no intuito de determinar a porcentagem de leveduras aderidas internalizadas a cada ponto pós-infecção. Os experimentos foram realizados em triplicata e quatro a dez campos microscópicos foram analisados. Os resultados são apresentados com média ± SEM (erro padrão da média ou *standard error of the medium*).

5.5. Extração de RNA total de leveduras de *P. brasiliensis* internalizadas

Após 6 h de infecção, as leveduras não fagocitadas eram removidas com RPMI pré-aquecido e os macrófagos infectados lisados pela adição da solução GTC (isotiocianato de guanidina 4 M, N-lauril sarcosina 0,5 %, citrato tri-sódico 50 mM e 2-mercaptoetanol 0,1 M). Este tratamento promove a lise dos macrófagos enquanto o fungo não é lisado uma vez que sua parede celular, rica em glicana e quitina, permanece intacta. As células leveduriformes foram recuperadas por centrifugação (8000 × g por 10 min) e usadas para o isolamento do RNA total de *P. brasiliensis* empregando o reagente Trizol (Invitrogen, EUA). A lise do fungo foi realizada por vigorosa agitação em 1 mL de Trizol na presença de pérolas de vidro (Sigma) por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse procedimento, as amostras eram centrifugadas (8000 × g por

2 min) para a remoção dos restos celulares do fungo e o lisado celular usado para a obtenção do RNA total.

A fim de permitir a completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos, as amostras homogeneizadas com Trizol eram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 400 µL de clorofórmio foi adicionado e após agitação vigorosa dos tubos, estes eram então submetidos à centrifugação (12000 × g por 15 minutos a 4°C). Após a centrifugação, a solução é separada em uma fase inferior fenol-clorofórmio vermelha, uma interfase, e uma fase aquosa superior. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa, a qual foi transferida para um novo tubo e o RNA recuperado por precipitação com álcool isopropílico. Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugação (1200 × g por 10 minutos a 4°C) o sobrenadante foi retirado e o precipitado de RNA lavado repetidamente com etanol 75% sob agitação e então submetido a uma nova centrifugação (7500 × g por 5 minutos a 4°C). Em seguida, o precipitado foi deixado secando à temperatura ambiente para posteriormente ser ressuscitado em 20 µL de água MilliQ livre de RNase. A quantidade e qualidade do RNA extraído eram avaliadas por meio da observação da razão das leituras espectrofotométricas nas densidades ópticas de 260 e 280 e visualização das bandas correspondentes aos rRNA 18S e 26S em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). O RNA extraído foi armazenado a -20 °C. Em um experimento típico onde eram utilizados 10-12 camundongos havia um rendimento de 2-4 µg de RNA total do fungo. O RNA total de levedura de *P. brasiliensis* crescido *in vitro* (controle) também foi extraído com TRIzol.

5.6. Microarranjos de cDNA

5.6.1. Construção dos microarranjos

Um total de 1.152 clones representando aproximadamente 14% do número de genes predito para *P. brasiliensis* (Reinoso *et al.*, 2005), derivados de uma biblioteca de cDNA das fases de micélio e levedura desse fungo (Andrade, 2006; Felipe *et al.*, 2005), foram depositados na forma de produtos de PCR em duas membranas de náilon (2,5 × 7,5 cm, Hybond N+ Amersham Biosciences) com cada uma contendo 576 seqüências em duplicata. Dentre os 1.152 clones de cDNA analisados, encontravam-se genes relacionados a processos biológicos potencialmente importantes na adaptação do fungo ao ambiente do hospedeiro, tais como: genes

associados à virulência, à resposta ao choque térmico e ao estresse oxidativo, à biogênese da parede celular, ao metabolismo geral, entre outros (Felipe *et al.*, 2005; Tavares *et al.*, 2005; Anexo 4 e 5, respectivamente). Os microarranjos foram preparados usando o robô *Generation III Array Spotter* (Amersham Molecular Dynamics) no laboratório de Genética da USP-Ribeirão Preto sob a coordenação do professor Doutor Geraldo Passos conforme descrito em detalhes anteriormente por nosso grupo (Felipe *et al.*, 2005; Andrade, 2006). Dois controles foram empregados: DNA genômico de *P. brasiliensis* e amostra contendo apenas água (pontos na membrana sem DNA) como controle de *background*. Em seguida, as membranas foram tratadas com as soluções desnaturante (NaOH 0,5 M e NaCl 1,5 M) e neutralizante (Tris HCl pH 7,4 1M; NaCl 1,5 M) por 20 minutos cada. Após lavagem, o DNA nas membranas foi fixado por 2 horas a 80°C seguido da exposição à iluminação UV.

5.6.2. Quantificação do DNA depositado nos microarranjos

Visando normalizar os dados obtidos a partir dos experimentos de hibridação dos microarranjos com as sondas de cDNA complexas (relativas às diferentes condições experimentais empregadas nesse estudo; ver item 5.6.3), as membranas eram inicialmente hibridadas com o oligonucleotídeo T3 radioativo (oligo T3), cuja seqüência está presente nos produtos de PCR depositados nas membranas para construção dos microarranjos.

Inicialmente as membranas foram pré-hibridadas a 42°C, durante 18 horas, em 12 mL de solução de pré-hibridação contendo SSC 5X (1X: citrato de sódio 0,03 M pH 7,0; NaCl 0,3 M), solução Denhardt's 5X (1X: Ficoll 200 mM, 200 mg/mL polivinil-pirrolidona e 20 mg/mL albumina sérica bovina), 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS) acrescida de 100 mg/mL de DNA esperma de salmão desnaturado. A reação de marcação do oligo T3 foi constituída por: 1 µg do oligo T3 (5' AATTAACCCTCACTAAAGGGA 3'), 3 µl [γ -³³P] ATP 5000 Ci/mmol (Amersham Biosciences), 1 µL da enzima T4 polinucleotídeo quinase (10 U/µL, New England Biolabs), 2,5 µL de tampão 10X da enzima (1X: Tris-HCl 70 mM, MgCl₂ 10 mM e ditiotreitól (DTT) 5 mM, pH 7,6) e água Milli-Q para um volume final de 25µl. A reação foi incubada durante 30 minutos a 37°C, seguida de uma nova incubação a 70°C por 5 minutos para inativar a enzima. A fim de eliminar o [γ -³³P] ATP não incorporado, a reação foi purificada em coluna de Sephadex G50 (Amersham Biosciences). Após a purificação, a sonda foi quantificada pela

contagem da radioatividade usando 1 μL da reação em 5 mL de solução cintiladora (Ultimagold, Packard) no aparelho de cintilação líquida Tri-carb 2100 (Packard).

Após a pré-hibridação o oligo T3 marcado foi então adicionado à solução de hibridação que prosseguiu por 18 horas a 42°C. Ao término da hibridação, as membranas foram lavadas com 1000 mL de solução SSC 2X e 0,1% SDS por 10 minutos, primeiramente à temperatura ambiente e a seguir, a 42°C por 5 minutos. Após 48 horas de exposição das membranas às placas sensíveis à radioatividade, a autoradiografia foi revelada no aparelho leitor de fósforo incorporado Cyclone (Packard). As imagens adquiridas representando a intensidade de cada sinal radioativo foi quantificada para a estimativa da quantidade de DNA depositado em cada ponto da membrana (ver 5.6.4 Detecção e quantificação dos sinais de hibridação). Após a obtenção das imagens as membranas foram desibridadas para serem utilizadas no experimento de hibridação com as sondas complexas. Para este fim, as membranas foram lavadas três vezes com 1000 mL de solução SSC 0,1X e 0,1% SDS por 1 hora a 68°C. Posteriormente, as membranas foram novamente expostas, por 48 horas, e a radioatividade monitorada como descrito acima a fim de garantir a retirada total do oligo T3 das membranas.

5.6.3. Preparo da sonda complexa e hibridação com os microarranjos

A sonda complexa foi preparada a partir de RNA total extraído do fungo recuperado da infecção *ex vivo* de macrófagos ou crescido em cultura (controle). Cerca de 10 μg de RNA total de cada amostra juntamente com 8 μg de oligo (dT)₂₅ foram aquecidos a 70°C durante 10 minutos e progressivamente resfriados a 42°C em um termociclador, garantindo o anelamento do oligo (dT)₂₅ às caudas poli-A dos RNA mensageiros (mRNAs). Em seguida, a síntese do cDNA, a ser empregado como sonda, foi realizada por 2 horas a 42°C em uma reação contendo: 3 μL de [α -³³P]dCTP 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ (3000Ci/mmol, Amersham Pharmacia), 0,6 μL dos dNTPs (20 mM de dATP, dTTP e dGTP), 0,6 μL de dCTP 120 μM , 2 μL da enzima transcriptase reversa (Superscript II RNase H- 200U/ μl , Invitrogen), 1 μL do inibidor de ribonuclease RNaseOUT (40U/ μl , Invitrogen), 6 μL do tampão da enzima 5X, 2 μL de DTT 0,1 M e água Milli-Q para volume final de 30 μL). Para a condição de *P. brasiliensis* internalizado ou crescido *in vitro*, seis membranas em pares foram hibridadas com a sonda complexa obtida a partir do RNA total. Devido à quantidade limitada de RNA extraído em um único experimento de infecção de macrófagos (~2-4 μg), os dados de expressão gênica analisados nesse estudo foram obtidos a

partir de três *pools* independentes de RNA (cada *pool*, contendo 10 µg, hibridado com um par de membranas). Cada *pool* foi derivado de quatro experimentos de infecção de macrófagos recuperados de 10-12 camundongos por experimento.

A fim de eliminar os mRNAs moldes e os rRNAs (RNA ribossômico), as sondas foram incubadas a 68°C durante 30 minutos na presença de 1 µL de SDS 10%, 1 µL de EDTA 0,5M e 3 µL de NaOH 3M, seguido de 15 minutos à temperatura ambiente. Para neutralização da reação foram adicionados 10 µL de Tris-HCl pH 7,2 1 M e 3 µL de HCl 2N. Após purificação das sondas em coluna de Sephadex G50 (Amersham Biosciences), foi realizada sua quantificação como já descrito. Dois microgramas de poli-A80 foram adicionados às sondas que foram desnaturadas por 5 minutos a 100°C, sendo então incubadas durante 2 horas a 65°C, com a finalidade de proporcionar a hibridação do oligo A80 com as caudas poli-T remanescentes da reação de transcrição reversa.

Um total de 100 µl da sonda complexa derivado da amostra experimental e controle foram hibridados com as membranas de náilon por 48 horas a 65°C. As membranas foram então lavadas durante 3 horas em solução de SSC 0,1X, SDS 0,1% a 68°C. Após as lavagens, as membranas foram expostas a placas sensíveis a radioatividade por 72 horas, para posterior detecção e quantificação dos sinais de hibridação.

5.6.4. Detecção e quantificação dos sinais de hibridação

Após o tempo de exposição e captação dos sinais de hibridação, as imagens foram digitalizadas pelo programa OpiQuant (Packard Instruments). Os pontos foram identificados e os sinais de hibridação foram quantificados por meio do programa BZScan (desenvolvido no TAGC-Inserm, Marseille, FR), disponível no endereço eletrônico <http://tagc.univ-nrs.fr>. Este programa realiza o cálculo de intensidade dos pontos correspondentes ao depósito de cada cDNA e seu respectivo sinal de hibridação com o reconhecimento da área limite do ponto (borda do ponto), através da criação de grades, transformando a somatória do sinal (*pixels*) em valores numéricos brutos. Desta forma, o BZScan é capaz de moldar a grade de quantificação do ponto e quantificar os valores de intensidade apenas nesta área, minimizando assim o efeito de interferências da intensidade (*background*). Este programa utiliza também o modo de visualização tridimensional do ponto para avaliação do alinhamento das grades de quantificação e dos cálculos realizados para o controle de interferência e saturação do sinal.

5.6.5. Normalização dos dados

A normalização dos dados de um experimento de microarranjo é necessária devido às diversas fontes de variações que ocorrem em um experimento típico como, por exemplo, eficiência de incorporação de material radioativo, concentração de DNAs fixados na membrana, quantidade de mRNA, eficiência da reação de transcrição reversa no preparo das sondas, os processos de lavagem das membranas e aquisição de suas imagens (Quackenbush, 2002). Esse processo de normalização permite a comparação dos valores de expressão entre diferentes membranas e diferentes eventos de hibridação. Inicialmente, a fim de corrigir a variação das quantidades de DNA das diferentes amostras depositadas em diferentes membranas, os valores brutos resultantes da hibridação com as sondas complexas tiveram seus valores divididos por aqueles obtidos com a hibridação feita com o oligo T3 marcado radioativamente. Em seguida, os valores obtidos foram subtraídos pela mediana do controle de *background* (água) somado com o desvio padrão do mesmo controle. Finalmente, e com intuito de minimizar as diferenças de hibridação entre os diferentes experimentos, os valores da intensidade de cada sinal de hibridação de um determinado gene foram divididos pela mediana das intensidades de hibridação desse mesmo gene em outras membranas.

5.6.6. Detecção de genes diferencialmente expressos

Para a detecção de genes diferencialmente expressos, utilizamos o programa SAM (*Significance analysis of microarray*) <http://www-start.stanford.edu/~tibs/SAM/index.html> (Tusher *et al.*, 2001). Este programa utiliza um método de análise baseado no teste-*t* de *Student* modificado para a detecção da expressão gênica diferencial em larga escala. Para avaliar se a indicação de um gene como diferencialmente expresso ocorre em função de desvios da média de um grupo experimental por contaminação de uma amostra discrepante em relação a este próprio grupo, o SAM utiliza testes de permutações balanceadas entre uma amostra de cada grupo experimental. A partir da constatação que as variações casuais são específicas para cada gene, o SAM indica que um gene é diferencialmente expresso baseando-se na razão entre a diferença das médias das situações experimentais, no caso *P. brasiliensis* internalizado ou crescido *in vitro*, e o

desvio padrão de cada gene calculado a partir das repetições experimentais. A diferença relativa $d(i)$ na expressão gênica é então definida pela equação:

$$d(i) = \frac{\overline{X}_p(i) - \overline{X}_c(i)}{S(i) + S_0}$$

$d(i)$ = diferença relativa
 $\overline{X}_p(i)$ = níveis médios da expressão do gene i de *P. brasiliensis* internalizado
 $\overline{X}_c(i)$ = níveis médios da expressão do gene i de *P. brasiliensis in vitro*
 $S(i)$ = desvio padrão de medidas repetidas de expressão (gene-específico)
 S_0 = constante positiva

onde $\overline{X}_p(i)$ e $\overline{X}_c(i)$ são definidos como níveis médios da expressão do gene nos estado p (*P. brasiliensis* internalizado) e c (*P. brasiliensis in vitro*), respectivamente. A dispersão gene-específica $S(i)$ é o desvio padrão das medidas de expressão repetidas enquanto que a constante positiva S_0 , no denominador da equação, assegura que a variância de $d(i)$ seja independente dos níveis de expressão gênica (Tusher *et al.*, 2001). Para a determinação de genes com mudanças significativas na expressão utilizou-se um gráfico de dispersão de $d(i)$ versus a diferença relativa esperada $d_E(i)$. Para a grande maioria dos genes $d(i) \sim d_E(i)$, mas alguns genes são representados por pontos distantes da linha $d(i) \sim d_E(i)$. As alterações na expressão dos genes que se encontram a uma distância maior do que o limiar Δ são consideradas significativas. O limiar Δ determina dois cortes horizontais: o menor valor positivo de $d(i)$ indica que um gene seja considerado significativamente induzido, e o valor menos negativo de $d(i)$ indica que um gene seja considerado significativamente reprimido (ver gráfico na **figura 3** nos Resultados).

A porcentagem de genes identificados por mudanças aleatórias é chamada de Taxa de Falsas Descobertas-FDR (*False Discovery Rate*) sendo definido como a proporção esperada de rejeições falsas ou falso-positivos. O cálculo de FDR e o número de genes com mudanças significativas estão intimamente relacionados com o limiar Δ , de maneira que à medida que o Δ diminui, o número de genes significativamente alterados aumenta, mas ao custo de um aumento de FDR. Ao utilizar o SAM o usuário escolhe o limiar Δ mais conveniente com base no nível de significância estimado pelo FDR e o número de genes com os quais se pretende trabalhar. Neste trabalho, adotou-se um $FDR \leq 5\%$.

O SAM possui ainda um fator para estimar a significância, chamado “*q-value*” (equivalente ao *p value*), que mede o quão significativo é a diferença de expressão de um determinado gene entre as condições de estudo. Valores com $q \leq 0,05$ foram considerados significativos. Em adição aos critérios estatísticos estabelecidos no SAM ($FDR \leq 5\%$ e $q \leq 0,05$) somente aqueles genes que tiveram a variação de sua expressão (*fold-change*) alterada em no

mínimo duas vezes (induzido ou reprimido) foram considerados como diferencialmente expressos.

5.6.7. Deposição dos dados do experimento de microarranjo em banco de dados público

Os dados do experimento de microarranjo referentes às hibridações e ao delineamento experimental foram depositados, respectivamente, sob os números de acesso A-MEXP-558 e E-MEXP-823 no banco de dados público *Array express* <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/> (Parkinson *et al.*, 2007). O *Array express* tem como objetivo padronizar o armazenamento e reprodução de informações essenciais mínimas que são comuns aos experimentos de microarranjo, de tal maneira que essa informação possa ser interpretada de forma precisa e potencialmente reproduzida e/ou verificada de forma independente.

5.7. Validação por RT-PCR em tempo real de genes diferencialmente expressos

Os resultados gerados nos experimentos de microarranjos podem ser influenciados por cada passo dessa metodologia complexa, desde a construção dos arranjos até a preparação das amostras (extração, marcação e hibridação) e obtenção das imagens do microarranjo (Rajeevan *et al.*, 2001). Dessa maneira os dados gerados por microarranjos devem ser validados por técnicas independentes de análise de expressão gênica. Atualmente a metodologia mais utilizada para tal validação é a RT-PCR em tempo real.

As mesmas amostras de RNA usadas para os experimentos de microarranjo, bem como uma amostra de RNA de *P. brasiliensis* internalizado derivada de um experimento independente, foram usadas para as análises de expressão gênica por RT-PCR em tempo real utilizando o sistema de detecção por SYBR Green, uma molécula fluorescente que se intercala à dupla fita de DNA. Após tratamento com DNaseI (Invitrogen), na presença de inibidor de RNase (Invitrogen), quantidades iguais de RNA (0,5 µg) foram transcritos de forma reversa (Superscript II, Invitrogen) utilizando oligo(dT)₁₂₋₁₈ e submetidos a PCR em tempo real. Os ensaios de amplificação foram realizados no aparelho 7900HT *Sequence Detection System* ABI PRISM (Applied Biosystems) em reações de 12 µL contendo 0,4 µM de cada oligonucleotídeo, 6 µL de solução completa para PCR contendo SYBR Green (2X) (Applied Biosystems) e 0,2 µL da reação síntese de cDNA como molde. Após a desnaturação inicial a 95°C por 10 min, as amplificações foram realizadas por 40 ciclos a 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. A utilização do

SYBR Green demanda cuidadosa padronização, pois este fluoróforo se intercala a qualquer dupla fita de DNA presente na reação. Dessa maneira, a quantificação do produto de PCR específico pode ser afetada pela formação de dímeros de oligonucleotídeos ou pela formação de produtos de PCR inespecíficos. A fim de confirmar a especificidade da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à análise da curva de desnaturação ou *melting curve*. Nesta curva, analisá-se a fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura, o que possibilita determinar a temperatura de dissociação ou *melting temperature* (T_m) de cada fragmento de DNA presente na reação de amplificação. Cada fragmento de DNA amplificado possui um T_m específico, o que permite a diferenciação entre os produtos resultantes (específicos ou não).

O método de comparação do ciclo limiar (CT) ou *crossing threshold* (Livak *et al.*, 2001), utilizando o gene constitutivo α -tubulina de *P. brasiliensis* (Goldman *et al.*, 2003) para normalização, foi empregado para a avaliação da variação da expressão (*fold-change*) de cada gene de interesse nas amostras derivadas de *P. brasiliensis* internalizado (experimento) quando comparado com aquelas derivadas do fungo crescido *in vitro* (controle). O CT é o número de ciclos no qual a quantidade de alvo amplificado atinge o limiar de fluorescência emitida ou *threshold* definido pelo pesquisador. O limiar deve estar obrigatoriamente na faixa onde a quantidade de fluorescência gerada pela amplificação das amostras é significativamente maior que a fluorescência de base ou *background*. No presente trabalho o limiar de fluorescência foi definido como sendo, no mínimo, dez vezes o desvio padrão da média da fluorescência de base emitida entre os ciclos 3 e 16 de amplificação. O método de comparação do CT tem como base de cálculo a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ onde $\Delta\Delta CT = (\Delta CT \text{ experimento} - \Delta CT \text{ controle})$, sendo que $\Delta CT \text{ experimento} = CT \text{ do gene de interesse no experimento} - CT \text{ do gene constitutivo no experimento}$ e $\Delta CT \text{ controle} = CT \text{ do gene de interesse no controle} - CT \text{ do gene constitutivo no controle}$. A equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ é baseada na amplificação exponencial da PCR e sua derivação e validação foram anteriormente descritas (Boletim do usuário Applied Biosystems No. 2 P/N 4303859 e Livak *et al.*, 2001).

Dois a três experimentos, em duplicata, foram realizados para todos os genes analisados. Todos os pares de oligonucleotídeos foram desenhados usando o programa *Primer Express* (Applied Biosystems), fundamentado nas seqüências obtidas do banco de dados do projeto transcriptoma de *P. brasiliensis* (Felipe *et al.*, 2005 e <http://www.biomol.unb.br/Pb-eng>), e estão listados na **tabela 1**.

Tabela 1. Oligonucleotídeos usados no experimento de RT-PCR em tempo real para validação dos resultados do microarranjo

PbAEST ^a	Gene	Senso (5'-3')	Anti-senso (5'-3')
50	<i>sod3</i>	CTGTTTCGCTGGGCTTTGC	TCAGTAGTGACGGCTTCCATCAT
269	<i>hsp60</i>	TATCACCACCACTGAAGAGATTGC	GCTTGCCAACATGGGTATCA
281	<i>metG</i>	GTTTCACGTCATTTCCCCTTATCT	CAGCCCCAGCCATTGTTG
3775	<i>fks</i>	AATTATTGCCTTCGCTCCCATA	GCCATCGCGAAGAGAACTG
2976	<i>fmdS</i>	CCGTCAGCCGAGGTCCTA	GCATTGGCCGAGAGGAGAT
5491	<i>eno</i>	GTAACCGAGACTGGGCTTCATC	GCCTCATGCTGACCGGTAGA

^a EST de *P. brasiliensis* (Felipe *et al.*, 2005) e <http://www.biomol.unb.br/>

5.8. Produção de ânion superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por macrófagos murinos infectados por *P. brasiliensis*

Após 6 h de incubação, o sobrenadante das culturas de macrófagos infectados por *P. brasiliensis* (como descrito no item 5.4) foi removido e as culturas lavadas com tampão Krebs-Ringer pré-aquecido (NaCl 130 mM, KCl 5 mM, MgSO₄ 1,3 mM, CaCl₂ 1,3 mM, Na₂HPO₄ 10 mM e dextrose 5mM). A produção de O₂⁻ foi determinada pela redução do ferrocitocromo *c* limitada por superóxido dismutase (SOD) (Russo *et al.*, 1989). As culturas de macrófagos infectadas foram incubadas a 37°C por 1,5 h em tampão Krebs-Ringer contendo Fe⁺³ citocromo *c* 80 µM (Type III; Sigma) com ou sem forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, 5 µg/mL; Sigma) a fim de estimular a produção de O₂⁻. Ademais, a fim de garantir a especificidade do experimento, adicionou-se 40 µg/ml de SOD (Sigma) a um outro conjunto de macrófagos infectados. Poços de placas controles continham citocromo *c* sem *P. brasiliensis* (culturas de macrófagos não

infectadas). Ao fim da incubação, os sobrenadantes foram coletados e a absorvância medida utilizando o comprimento de onda 550 nm. Os resultados foram calculados e são expressos em nmol por 5×10^5 macrófagos utilizando a fórmula: nmol O_2^- produzido = (valor da absorvância da cultura experimental – valor da absorvância da cultura tratada com SOD) $\times 10,9$ nmol (quantidade de citocromo *c* adicionado).

A produção de H_2O_2 foi medida pelo método da oxidação do vermelho de fenol dependente da peroxidase de raiz forte (Pick, 1986). Culturas de macrófagos infectadas ou não com *P. brasiliensis* tiveram seus sobrenadantes retirados e então incubadas a 37°C por 1,5 h em tampão fosfato contendo vermelho de fenol 0,56 mM e peroxidase 20 U/ml (Type II, Sigma) com ou sem PMA 5 μ g/ml. Após a medida da absorvância a 620 nm seguido da adição de 10 μ l de 1 M NaOH por poço da placa, o peróxido produzido foi quantificado por meio da comparação das leituras de absorvância com curva padrão apresentando concentrações conhecidas de H_2O_2 . Os resultados são expressos em nmol por 5×10^5 macrófagos.

Os resultados dos experimentos de detecção de O_2^- e H_2O_2 são apresentados como média \pm SEM derivados de dois experimentos realizados em triplicata. A análise estatística das diferenças entre o grupo experimental e controle foram avaliadas pelo teste *t* (pareado e bicaudal) usando o programa GraphPad Prism versão 3.02, GraphPad Software, EUA. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5.9. Análise por Northern-blot da expressão do gene *sod3* após tratamento *in vitro* de *P. brasiliensis* com H_2O_2 e menadiona

Após sete dias de crescimento em meio Fava-Netto, leveduras de *P. brasiliensis* foram crescidas em meio YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2% e dextrose 2%) contendo menadiona (2-metil 1,4 naftoquinona) 50 mM (Sigma) ou H_2O_2 50 mM a 36 °C, 140 rpm por 0, 30, 50 e 60 min. RNA total das leveduras crescidas em menadiona ou H_2O_2 foi extraído nos diferentes tempos de tratamento utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), conforme descrito anteriormente. Aproximadamente 13 μ g de RNA foi separado por eletroforese em gel de agarose desnaturante (formaldeído 2,2 M) 1,5% em tampão de migração (MOPS 20 mM, acetato de sódio 2 mM e EDTA 1 mM, pH 8.0), e então transferido por capilaridade para membrana de nylon (Hybond N⁺, Amershan). As membranas foram primeiramente incubadas em solução de pré-hibridação (6X SSPE (NaCl 0,9 M, NaH₂PO₄ 70 mM, EDTA 3,3 mM), reagente de

Denhardt's 5X, SDS 0,5%, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão e formamida 50%) durante 2 horas a 42°C. Em seguida, a hibridação das membranas com a sonda para *sod3* marcada com [α^{32} P]-dATP foi realizada durante a noite nas mesmas condições descritas na pré-hibridação. A sonda para *sod3* foi obtida por PCR usando oligonucleotídeos obtidos por meio da análise da seqüência de *sod3* depositada no banco de dados do projeto transcriptoma de *P. brasiliensis* (<http://www.biomol.unb.br/Pb-eng>). O produto de PCR foi marcado radioativamente usando o kit Random primer (Invitrogen), purificado (colunas MicroSpin S-300 e S-400 HR, Amershan) e então utilizado. Posteriormente a hibridação, as membranas foram lavadas até uma estrigência final de 2X SSPE-0,1% SDS a 65°C por 25 min, e expostas a filme sensível a radioatividade e visualizados o aparelho leitor de fósforo Typhoon 9210 PhosphorImager (GE HealthCare).

Os sinais de hibridação foram quantificados usando o programa ImageQuant (Molecular Dynamics, USA), considerando a banda do RNA ribossomal 18S como controle da quantidade de RNA total depositado no gel (normalização) a fim de cálculo dos níveis de expressão relativa de *sod3* ao longo do tempo.

6. RESULTADOS

6.1. Cinética da internalização de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos peritoneais murinos

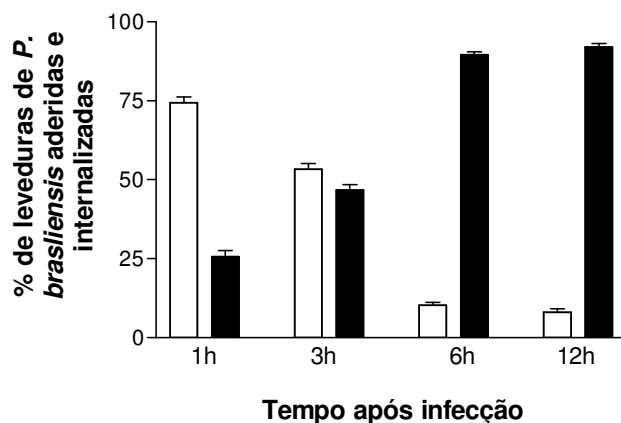
A fim de investigar uma resposta transcricional inicial de *P. brasiliensis* ao ambiente do macrófago, uma análise da cinética da internalização do fungo foi realizada. A porcentagem de internalização de *P. brasiliensis* aumentou progressivamente ao longo de 12 h de co-cultura, sendo que somente após 6 h aproximadamente 90% das leveduras estavam internalizadas (**Figura 1A**). Dessa maneira foi escolhido o ponto de 6 h pós-infecção para análise do perfil de expressão gênica empregando o microarranjo, já que esse ponto representaria um contato inicial com o ambiente hostil do macrófago. Uma microfotografia representativa dos experimentos de 6 h pós-infecção está representada na **figura 1B**. Pode-se observar claramente, tanto em leveduras internalizadas como aderidas, a espessa parede dupla característica das leveduras de *P. brasiliensis*.

6.2. Extração de RNA total de *P. brasiliensis* internalizado

O uso da metodologia de microarranjo na investigação do perfil de expressão de células bacterianas ou fúngicas quando em co-cultura com células de hospedeiro é obviamente complicado pelo fato do RNA do hospedeiro encontrar-se em excesso. A fim de evitar possíveis interferências desse RNA durante as hibridações nos microarranjos utilizou-se um protocolo de lise diferencial baseado em uma solução contendo isotiocianato de guanidina (Monahan *et al.*, 2002). O uso dessa solução proporcionava a lise dos macrófagos murinos e a liberação das leveduras internalizadas intactas, as quais eram recuperadas por centrifugação e submetidas à extração do RNA total. Utilizando esse protocolo fomos capazes de obter RNA de *P. brasiliensis* de alta qualidade sem contaminação aparente (avaliado por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio) com RNA dos macrófagos murinos (**Figura 2**). Outra vantagem proporcionada pelo protocolo de lise diferencial é que apesar de não lisar as leveduras de *P. brasiliensis*, a solução de isotiocianato de guanidina mata o fungo (viabilidade determinada

usando o corante vital verde de Janus, dado não mostrado) impedindo nova alteração da expressão gênica após a liberação do ambiente do macrófago.

A



B

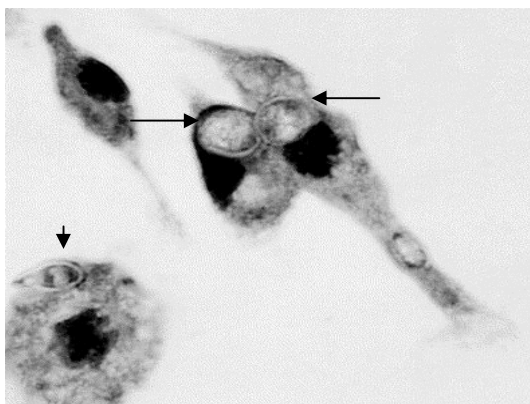


Figura 1. (A) Percentagem de leveduras de *P. brasiliensis* aderidas (barra branca) e internalizadas (barra preta) ao longo de 12 horas de infecção *ex vivo* de macrófagos murinos peritoneais conforme descrito no material e métodos. (B) Uma microfotografia (1000 x) representativa do ponto de 6 horas pós-infecção. Setas maiores: leveduras internalizadas; Seta menor: levedura aderida lateralmente. Macrófagos e leveduras opsonizadas foram incubados obedecendo a uma razão de levedura/macrófago de 1:5 a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Os dados mostrados são derivados de dois experimentos realizados em triplicata (média ± SEM).

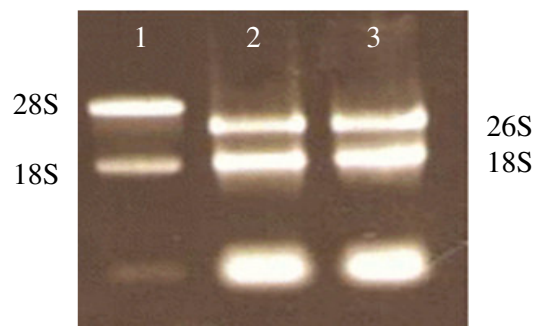


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1% não desnaturante corado com brometo de etídeo representativo de um experimento de extração de RNA total de *P. brasiliensis* quando em co-cultura com macrófagos peritoneais durante 6 horas. 1. RNA total de macrófagos peritoneais não infectados 2. RNA total de *P. brasiliensis* recuperado da co-cultura. 3. RNA total de *P. brasiliensis* extraído do fungo crescido em cultura (Fava-Netto). Aproximadamente 1 µg de RNA total foi aplicado em cada caneleta.

6.3. Identificação de genes de *P. brasiliensis* cuja expressão foi modulada após internalização por macrófagos murinos

Dentre os 1152 genes empregados na confecção do microarranjo (Anexo 1), a análise estatística dos dados utilizando o programa SAM revelou que o microambiente do macrófago induziu significativamente a expressão diferencial de 213 genes (**Figura 3**). Porém, somente aqueles genes que tiveram a variação de sua expressão alterada duas vezes (induzido ou reprimido) foram considerados para análises posteriores. Tal critério reduziu o número de genes modulados para 152 (26 induzidos e 126 reprimidos), quando comparamos *P. brasiliensis* intracelular com aquele crescido *in vitro* (Anexo 2). Baseado nos achados de trabalhos de microarranjos que avaliaram a expressão gênica de bactérias e fungos em resposta ao ambiente de células fagocíticas (Schnappinger *et al.*, 2003; Lorenz *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2005; Chatterjee *et al.*, 2006), selecionamos genes que tiveram sua expressão induzida ou reprimida em 6 h de co-cultura para discussão (**Tabela 2**). Entre os genes induzidos, estão aqueles que codificam para proteínas relacionadas ao estresse oxidativo (superóxido dismutase Cu,Zn) e nutricional (cistationina beta-liase). Análises previamente realizadas por nosso grupo (Castro *et al.*, 2005;

Pessoa, 2006) mostraram que a seqüência deduzida de aminoácidos do gene da superóxido dismutase Cu,Zn (SOD), representado pela PbAEST 50 do transcriptoma das formas de levedura e micélio de *P. brasiliensis* (Felipe *et al.*, 2005), corresponde a uma proteína predita cuja análise de seqüência sugere ser uma SOD glicosilfosfatidilinositol (GPI)-ancorada. Essa seqüência de *P. brasiliensis* apresentou alta similaridade a SOD Cu,Zn GPI-ancorada de *Coccidioides pasadasii* e *C. albicans* (*sod5*) (Martchenko *et al.*, 2004; Fradin *et al.*, 2005). Devido a outras duas PbAESTs relacionadas a SODs já descritas para *P. brasiliensis* (Felipe *et al.*, 2005), a seqüência PbAEST 50 foi designada *sod3*, tendo sido depositada no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information- www.ncbi.nih.gov) sob o número de acesso DQ832188.

O gene *hsp60* que codifica para proteína de choque térmico de 60 kDa também teve sua expressão induzida. Além de sua atividade intrínseca de chaperona, tem sido demonstrado um papel importante da proteína HSP60 na proteção contra agentes do estresse oxidativo (Cabiscol *et al.*, 2002). Outros genes que tiveram um aumento nos níveis de seus transcritos estão relacionados à cadeia transportadora de elétrons (*qrc8* e *cox17p*) e a proteínas ribossomais. Ademais, o aumento da expressão de três genes relacionados a histonas sugere que *P. brasiliensis* responde ao ambiente intracelular dos macrófagos com mudanças no empacotamento da cromatina.

Entre os genes cuja expressão foi reprimida, cinco codificam para proteínas associadas a glicólise/gliconeogênese, sugerindo provavelmente um ambiente depletado de fonte de carbono complexa (glicose) no interior das células fagocíticas. Especificamente, o gene unicamente relacionado à glicólise foi o *pfkA* que codifica para fosfofrutoquinase, o qual teve sua expressão diminuída mais de três vezes no *P. brasiliensis* fagocitado quando comparado com aquele crescido *in vitro*. A fosfofrutoquinase é uma enzima regulatória chave da glicólise, catalisando a fosforilação irreversível de frutose-6-fosfato para frutose-1,6-bifosfato.

Os genes codificando a 1,3-β-D-glicana sintase (*fks*) e formamidase (*pbfmd*) também foram reprimidos (-3,5 e -22-vezes, respectivamente). Interessantemente, a 1,3-β-D-glicana sintase catalisa a síntese de β-glicana, um componente polissacarídeo importante da parede celular de fungos e que apresenta uma atividade imunoestimulatória (Brown *et al.*, 2003).

Significant: 213
Median # false significant: 2.39437

SAM Plot

Delta 1.80370
Fold Change

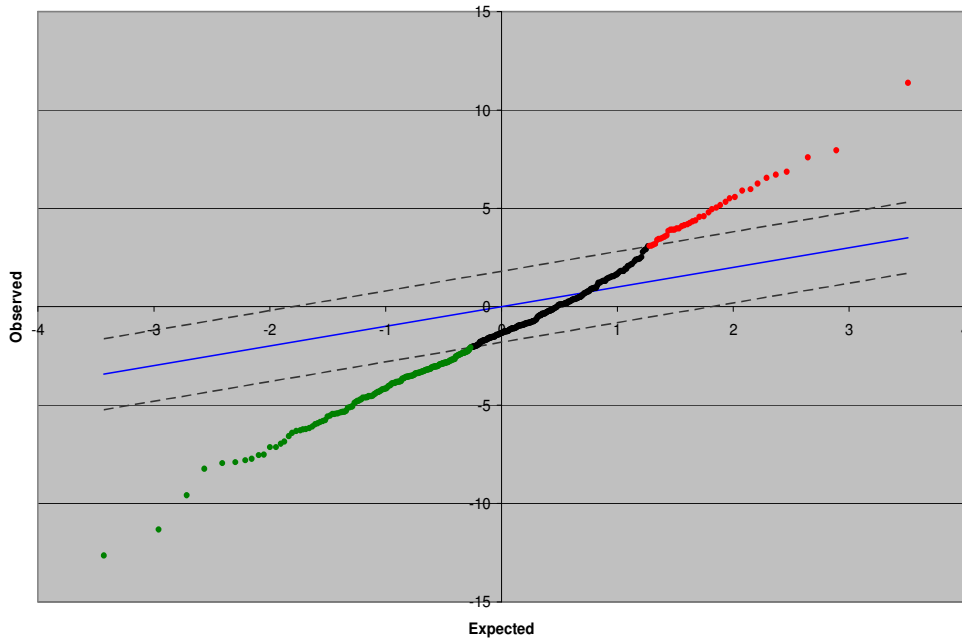


Figura 3. Genes diferencialmente expressos em *P. brasiliensis* internalizados por macrófagos murinos quando comparados com o fungo crescido *in vitro*. Significância estatística analisada pelo programa SAM. Comparação entre a diferença relativa da expressão gênica observada $d(i)$ e esperada $d_E(i)$. A linha azul contínua é a região onde $d(i) \sim d_E(i)$. As linhas tracejadas são cortes a uma distância Δ da linha contínua. Os pontos verdes representam genes que se afastaram da linha $d(i) \sim d_E(i)$, a uma distância $< \Delta$, sendo considerados genes significativamente reprimidos e os pontos vermelhos são genes que se afastaram da linha $d(i) \sim d_E(i)$, a uma distância $> \Delta$, sendo considerados induzidos.

Tabela 2. Genes selecionados que tiveram expressão diferencial em leveduras de *P. brasiliensis* fagocitadas por macrófagos murinos

	PbAEST ^a	Função atribuída	EC	Varição da expressão ^b	Gene ortólogo	Número de acesso/ Melhor <i>hit</i> organismo / E- value ^c
Estresse oxidativo	50	Cu-Zn superóxido dismutase	1.15.1.1	13,8	<i>sod</i>	ABB36775 / <i>Coccidioides posadasii</i> / 1e-44
Biosíntese de aminoácido	281	Cistationina beta-liase	4.4.1.8	3,8	<i>metG</i>	AAB03241 / <i>Emericela. nidulans</i> / e-104
Proteína de choque térmico	269	60 kDa proteína de choque térmico	-	2,0	<i>hsp60</i>	O60008 / <i>P. brasiliensis</i> / e-140
Respiração	284	Ubiquinol citocromo redutase, subunidade VIII	-	3,2	<i>qcr8</i>	EAS30263 / <i>C. immitis</i> / 9e-32
	500	Transportador de cobre mitocondrial	-	2,0	<i>cox17p</i>	AAAY64186 / <i>P. brasiliensis</i> / 3e-16
Histonas	1230	Histona H3	-	4,2	<i>hht2</i>	CAA39154.1 / <i>E. nidulans</i> / 2e-68
	1873	Histona H4	-	8,1	<i>hhf2</i>	AAL38972.1 / <i>Neurospora crassa</i> / 8e-39
	2069	Histona H2A	-	3,4	<i>htz1</i>	CAA99011.1 / <i>S. cerevisiae</i> / 1e-20
Maquinaria tradução	1006	40S proteína ribossomal S15	-	2,3	<i>rps15</i>	NP_014602 / <i>S. cerevisiae</i> / 2e-46
	654	40S proteína ribossomal S24	-	2,3	<i>rps24</i>	NP_010997 / <i>S. cerevisiae</i> / 3e-38
	857	40S proteína ribossomal S27	-	2,7	<i>rps27</i>	NP_012766 / <i>S. cerevisiae</i> / 2e-32
	1484	40S proteína ribossomal S31	-	4,8	<i>rps31</i>	NP_013268 / <i>S. cerevisiae</i> / 2e-55
	195	60S proteína ribossomal L12	-	2,0	<i>rpl12</i>	NP_010860 / <i>S. cerevisiae</i> / 9e-53
	477	60S proteína ribossomal L21A	-	2,4	<i>rpl21</i>	NP_009750 / <i>S. cerevisiae</i> / 4e-56

	3213	60S proteína ribossomal L24	-	2,7	<i>rpl24</i>	NP_011484 / <i>S. cerevisiae</i> / 1e-32
	3528	60S proteína ribossomal L27	-	2,7	<i>rpl27</i>	NP_010759 / <i>S. cerevisiae</i> / 2e-33
	1317	60S proteína ribossomal L28	-	3,7	<i>Rpl28</i>	NP_013176 / <i>S. cerevisiae</i> / 1e-83
	5077	60S proteína ribossomal L41	-	2,1	<i>rpl43</i>	NP_015368 / <i>S. cerevisiae</i> / 9e-28
	2599	60S proteína ribossomal L8	-	2,3	<i>rpl8</i>	NP_013055 / <i>S. cerevisiae</i> / 1e-103
	551	60S proteína ribossomal L35	-	2,8	<i>rpl35</i>	NP_010090 / <i>S. cerevisiae</i> / 2e-22
	81	60S proteína ribossomal L42	-	2,1	<i>rpl42</i>	NP_014237 / <i>S. cerevisiae</i> / 4e-52
Glicólise	3624	Fosfofrutoquinase	2.7.1.11	-3,6	<i>pfkA</i>	Q4W9B8 / <i>A. fumigatus</i> / 1e-40
Glicólise/ Gliconeogênese	3698	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	1.2.1.12	-2,4	<i>pbgadph</i>	AAP42760 / <i>P. brasiliensis</i> / 1e-34
	42	Fosfoglicerato quinase	2.7.2.3	-2,2	<i>pgk</i>	XP_658850 / <i>Aspergillus nidulans</i> / 2e-174
	4820	Fosfoglicerato mutase	5.4.2.1	-5,3	<i>gpmA</i>	XP_754690 / <i>A. fumigatus</i> / 5e-121
	2976	Enolase	4.2.1.11	-5,2	<i>eno</i>	AAK49451.1 / <i>A. fumigatus</i> / 7e-69
Parede celular	3775	1,3 β-glicana sintase	2.4.1.34	-3,5	<i>fks</i>	AAD37783.1 / <i>P. brasiliensis</i> / 1e-60
Metabolismo de nitrogênio	5491	Formamidase	3.5.1.49	-22	<i>pbfmd</i>	AAN87355 / <i>P. brasiliensis</i> / 1e-111

^a (23) e <http://www.biomol.unb.br/Pb-eng>

^b Números positivos e negativos representam genes induzidos e reprimidos, respectivamente.

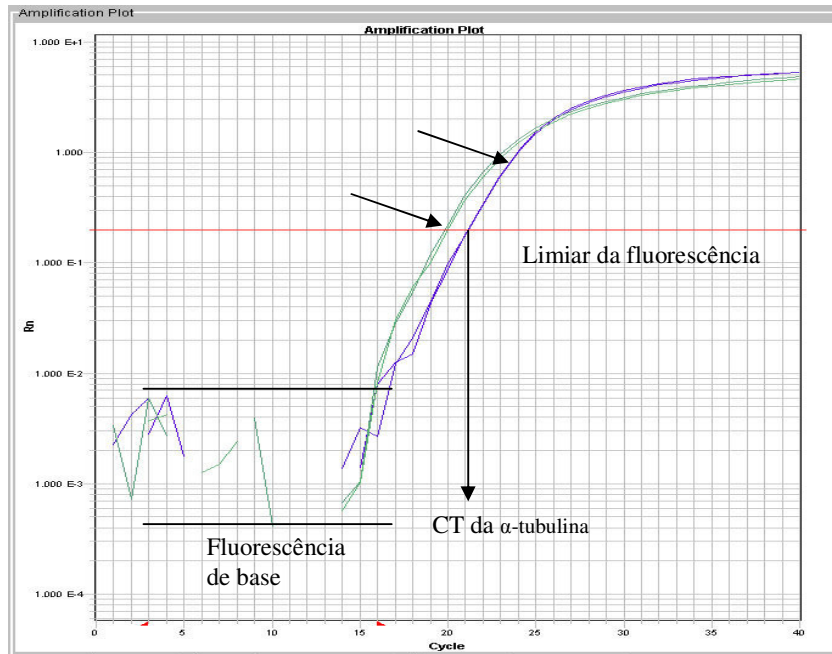
^c Análise por BLASTx realizada no banco de dados do NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

6.4. Validação dos dados do microarranjo

A fim de validar os dados gerados pelos experimentos de microarranjo, a técnica de RT-PCR em tempo real foi realizada empregando as mesmas amostras de RNA empregadas no microarranjo. Ademais, RNA de *P. brasiliensis* derivado de um experimento de infecção independente também foi utilizado. Selecionamos três genes que tiveram um maior acúmulo de seu respectivo mRNA (*sod3*, *hsp60* e *metG*) e três que apresentaram menores níveis de transcrito (*fks*, *fmdS* e *eno*) quando na internalização de *P. brasiliensis* por macrófagos murinos.

A figura 4 mostra as curvas de amplificação do experimento de RT-PCR em tempo real representativo para o gene *sod3* derivado de *P. brasiliensis* cultivado *in vitro* (**Figura 4 A1**) e após internalização por macrófagos (**Figura 4 A2**). A alta especificidade dessa reação pode ser avaliada pelos picos de desnaturação (gerada a partir da derivada da intensidade de fluorescência da curva de desnaturação) representada na **figura 5**, onde se observa um único pico de *T_m* (um para cada gene) denotando um único produto. Os valores de CT obtidos pela análise das curvas de amplificação foram utilizados na avaliação da variação da expressão (*fold-change*) de cada gene de interesse por meio do método de comparação do CT, utilizando o gene constitutivo que codifica para α -tubulina de *P. brasiliensis* para normalização (**Tabela 3**), conforme descrito no material e métodos. Observou-se que o perfil de expressão (induzido ou reprimido) de todos os genes avaliados foi o mesmo obtido pela análise do experimento de microarranjo. A magnitude da variação da expressão determinada pelas duas metodologias foi relativamente diferente, um resultado não surpreendente considerando as diferenças técnicas nos métodos de análise e normalização empregados para RT-PCR em tempo real e microarranjo.

A1



A2



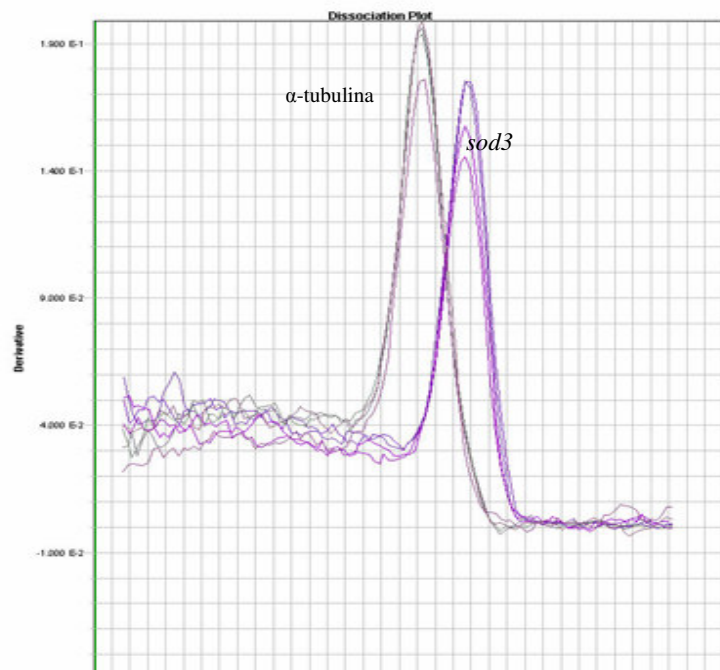


Figura 5. Picos de desnaturação de *sod3* e α -tubulina. Após o término da reação, uma etapa de dissociação é realizada para visualizar a cinética de dissociação dos produtos amplificados. Aumenta-se a temperatura de forma linear e a fluorescência de cada amostra é representada graficamente. O eixo da ordenada mostra a derivada da intensidade da fluorescência e o da abscissa, a temperatura.

Tabela 3. Validação por PCR em tempo real dos dados do microarranjo

PbAEST	Gene	Variação da expressão ^a	
		Microarranjo	PCR em tempo real ^b
50	<i>sod3</i>	13,8	3,9
269	<i>hsp60</i>	2,0	6,0
281	<i>metG</i>	3,2	1,4
3775	<i>fks</i>	-3,5	-3,4
2976	<i>eno</i>	-5,2	-1,2
5491	<i>pbfmd</i>	-22,0	-5,2

^a Números positivos e negativos representam genes induzidos e reprimidos, respectivamente.

^b Média da variação da expressão de dois a três experimentos realizados em duplicata.

6.5. Produção de superóxido e peróxido de hidrogênio por macrófagos murinos infectados por *P. brasiliensis*

Diante dos resultados do microarranjo, os quais indicavam um importante papel do estresse oxidativo na regulação da expressão gênica de *P. brasiliensis* intracelular (aumento nos níveis de mRNA de *sod3*, *hsp60*, *qcr8* e *cox17p*), investigamos a produção de O_2^- e H_2O_2 por macrófagos murinos infectados por esse fungo. A **tabela 4** mostra que macrófagos infectados tiveram um aumento significativo em mais de 4 e 5 vezes na produção de O_2^- e H_2O_2 , respectivamente, quando comparado com macrófagos não infectados. Esses resultados corroboram a idéia de que o fungo estava sob considerável estresse oxidativo no interior dos macrófagos, o que provavelmente levou a um maior acúmulo dos transcritos de genes relacionados à detoxificação de radicais de oxigênio e proteção contra seus efeitos tóxicos. Como controle positivo da reação, macrófagos infectados ou não quando estimulados com PMA produziram concentrações semelhantes de O_2^- e H_2O_2 , sugerindo uma capacidade similar na produção desses radicais independente da presença do fungo.

Tabela 4. Produção de ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por macrófagos murinos infectados por *P. brasiliensis* na presença ou ausência de PMA^a

Condição	O_2^- (nmoles/ 5×10^5 macrófagos)	H_2O_2 (nmoles/ 5×10^5 macrófagos)
Macrófagos infectados	$5,5 \pm 0,5^b$	$4,2 \pm 0,4^b$
Macrófagos não infectados	$1,3 \pm 0,6$	$0,8 \pm 0,3$
Macrófagos infectados + PMA	$49,3 \pm 3,7$	$43,1 \pm 2,7$
Macrófagos não infectados + PMA	$52,8 \pm 2,6$	$40,1 \pm 1,7$

^a Média \pm erro padrão da média de resultados de dois experimentos realizados em triplicata. A produção de O_2^- foi determinada pela redução de citocromo *c* limitada por SOD e a de H_2O_2 pela oxidação do vermelho de fenol dependente de peroxidase.

^b Estatisticamente diferente ($p < 0,01$) quando comparado com macrófagos não infectados, utilizando teste *t*.

6.6. Análise por Northern-blot dos níveis do transcrito de *sod3* após tratamento *in vitro* de *P. brasiliensis* com menadiona e H₂O₂

Considerando a indução da expressão de *sod5* de *C. albicans* pelo tratamento *in vitro* com agentes geradores intra- e extracelular de O₂⁻ (menadiona e riboflavina, respectivamente) bem como com H₂O₂ (Martchenko *et al.*, 2004; Fradin *et al.*, 2005), investigamos os níveis do transcrito de *sod3* em resposta a exposição *in vitro* de *P. brasiliensis* a menadiona e H₂O₂. A **figura 6** revela que sob o tratamento com alta concentração de menadiona (50 mM) por 60 minutos, *sod3* teve um aumento no nível do seu transcrito em mais de quatro vezes quando comparado com o controle (0 minuto). Um resultado similar foi obtido na condição de estresse induzido por H₂O₂. Dessa maneira, esses resultados são condizentes com o aumento da produção de O₂⁻ e H₂O₂ por macrófagos infectados e o aumento dos níveis de mRNA de *sod3* no fungo intracelular, como previamente mostrado pelos dados do microarranjo e RT-PCR em tempo real para o fungo internalizado pelos macrófagos.

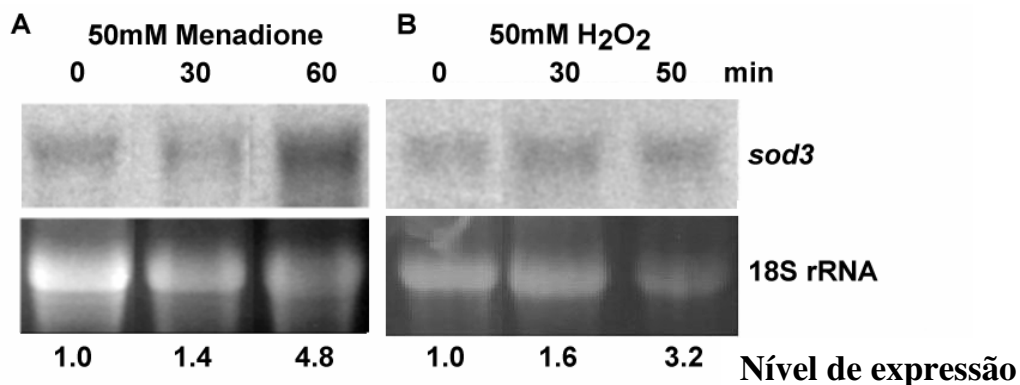


Figura 6. Análise por northern blot dos níveis do transcrito *sod3* de *P. brasiliensis* durante tratamento *in vitro* com menadiona e H₂O₂. Quantidades iguais de RNA total extraído das leveduras tratadas com 50 mM menadiona (A) ou 50 mM H₂O₂ (B) por diferentes períodos de tempo foram separados por eletroforese em gel desnaturante, transferidos para membranas de náilon e sondados com fragmento de DNA relativo ao gene *sod3* amplificado por PCR. Os sinais de hibridação foram quantificados considerando a banda do RNA ribossomal 18S como controle

da quantidade de RNA total depositado no gel a fim de calcular os níveis relativos do transcrito *sod3* ao longo do tempo.

Figura 4. Curvas de amplificação representativa de um experimento típico de RT-PCR em tempo real. São mostrados os resultados obtidos para os genes *sod3* e α -tubulina de *P. brasiliensis* *in vitro* (A1) e após internalização por macrófagos murinos (A2). Os gráficos mostram a variação da intensidade de fluorescência (na ordenada) com o número de ciclos de amplificação (abscissa). Cada curva representa a amplificação de um gene na condição indicada. O limiar da detecção da fluorescência está representado por uma linha vermelha horizontal. *Pb-m Φ : *P. brasiliensis* internalizado.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo descreve pela primeira vez o perfil transcricional de *P. brasiliensis* em resposta à internalização por macrófagos, um tipo celular necessário para o controle da infecção mediada por esse fungo. O estilo de vida intracelular de *P. brasiliensis* deve ser essencial para sua habilidade de permanecer latente e/ou poder disseminar em indivíduos susceptíveis. A fim de obter um melhor entendimento da complexa relação entre esse fagócito e o fungo, realizamos experimentos com a tecnologia de microarranjo comparando o perfil transcricional de 1152 genes de *P. brasiliensis* fagocitado por macrófagos murinos peritoneais com aquele crescido *in vitro*. Inicialmente, procuramos analisar a cinética de internalização do fungo pelos macrófagos a fim de estabelecer um ponto inicial da interação para análise pelo microarranjo. Somente após 6 horas de infecção *ex vivo*, mais de 90% das leveduras foram fagocitadas. Esse resultado está de acordo com estudos anteriores mostrando que, ao contrário do observado para outros fungos patogênicos, *P. brasiliensis* não é rapidamente fagocitado (Brummer *et al.*, 1988a,b, 1989; Newman *et al.*, 1990; Vazquez-Torres *et al.*, 1997; Lorenz *et al.*, 2004). Esse fato provavelmente deve-se, em parte, as glicoproteínas gp43 e gp70 secretadas por *P. brasiliensis*, as quais exercem efeitos inibitórios na capacidade fagocítica de macrófagos murinos peritoneais (Flavia-Popi *et al.*, 2002; de Mattos Grosso *et al.*, 2003).

7.1. Genes relacionados ao metabolismo

O fagossomo é descrito como uma organela pobre em glicose e aminoácidos (Schnappinger *et al.*, 2003; Lorenz *et al.*, 2004). Tal carência de nutrientes induz uma resposta adaptativa similar em fungos e bactérias intracelulares a fim de sobreviverem no interior dos macrófagos (Amer *et al.*, 2002; Lorenz *et al.*, 2004; Chatterjee *et al.*, 2006). Pouco tempo após a fagocitose, a bactéria gram-positiva *Listeria monocytogenes* e *C. albicans* têm uma forte redução na expressão de genes envolvidos na glicólise (Lorenz *et al.*, 2004; Chatterjee *et al.*, 2006). Mostramos aqui que *P. brasiliensis* recém fagocitado também parece sentir e responde ao ambiente depletado de glicose do fagossomo. O gene que codifica para fosfofrutoquinase (*pfkA*), a principal enzima regulatória da via glicolítica, teve sua expressão reduzida em três vezes quando comparado com o controle (fungo crescido *in vitro*). Ademais, os níveis de transcritos de quatro dos cinco genes codificando enzimas envolvidas na segunda parte da glicólise (*pbgapdh*,

pgk, *gpmA* e *eno*) também foram reduzidos. A segunda parte da glicólise corresponde aqueles cinco passos na conversão de gliceraldeído-3-fosfato para piruvato com formação acoplada de ATP.

Interessantemente, não observamos uma indução da expressão do gene *ic11* (isocitrato liase), o qual codifica a enzima chave do ciclo do glioxilato, como tem sido descrito para alguns patógenos bacterianos e fúngicos fagocitados, principalmente *M. tuberculosis* e *C. albicans* (Schnappinger *et al.*, 2003; Lorenz *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2005). A ativação do ciclo do glioxilato em resposta a fagocitose é descrito como uma importante adaptação de patógenos intracelulares ao microambiente pobre em glicose do macrófago, já que permite a assimilação de fontes simples de carbono (como acetato) para a gliconeogênese (Lorenz & Fink, 2002). Por outro lado, recentemente nosso grupo utilizando a técnica de RT-PCR semi-quantitativo relatou que *ic11* tinha sua expressão induzida em resposta ao crescimento *in vitro* de leveduras de *P. brasiliensis* em meio contendo acetato como única fonte de carbono e também quando fagocitado por macrófagos da linhagem J774 em nove horas de co-cultura (Derengowski *et al.* - submetido- Anexo 7). Apesar de estatisticamente significativo, o aumento dos níveis de mRNA de *ic11* nas condições acima citadas quando comparadas com o respectivo controle (a levedura crescida *in vitro* em meio contendo 4% de glicose) era discreto, com a levedura controle apresentando um nível basal de mRNA de *ic11* significativo. De forma contrária, concentrações baixas de glicose (0,1 %) são suficientes para inibir a expressão de *ic11* em *C. albicans* (Barelle *et al.*, 2006). Dessa maneira, esses dados sugerem que mesmo em níveis de glicose elevados, há um acúmulo de transcritos *ic11* em leveduras de *P. brasiliensis*. Esse fato é condizente com aqueles resultados anteriormente descritos no projeto transcriptoma de *P. brasiliensis* (Felipe *et al.*, 2005), onde os níveis de transcritos *ic11* em leveduras crescidas em meio rico a 37°C avaliados por subtração eletrônica, microarranjo e northern-blot eram substancialmente elevados quando comparados com a forma miceliana do fungo crescidas a 25°C. Nesse contexto, a regulação da expressão de *ic11* em *P. brasiliensis* deve sofrer controle tanto pela temperatura como pela fonte de carbono. Assim, a não observação do aumento dos níveis de transcrito de *ic11* no presente estudo pode ser resultado das diferenças metodológicas com o trabalho de Derengowski *et al.* onde provavelmente um maior tempo de internalização do fungo pelo macrófago tornou perceptível, mesmo que de forma relativamente discreta, um aumento dos níveis do transcrito de *ic11*. Esses resultados são condizentes com aqueles recentemente descritos para *P. marneffei* (Cánovas & Andrianopoulos, 2006). Esse fungo, também um

patógeno dimórfico de humanos, tem a expressão do gene *acuD*, codificando ICL, regulado tanto pela temperatura como pela fonte de carbono. Uma análise por northern-blot utilizando RNA isolado de células crescidas em meio contendo glicose ou acetato como fonte de carbono demonstrou que a 25°C a expressão de *icl1* é dependente da fonte de carbono, sendo sua expressão induzida quando o fungo era crescido em acetato enquanto que na presença de glicose sua expressão não foi detectada. Entretanto, a 37°C, *icl1* era expresso tanto na presença de glicose como na de acetato, sendo os níveis de seu transcrito substancialmente maior do que a 25°C. A presença do acetato no meio de cultura a 37°C somente induziu de forma tênue a expressão de *acuD* quando comparado com os níveis encontrados nessa temperatura em glicose. Esses resultados em conjunto demonstram um padrão diferente de regulação da expressão de *icl* entre fungos dimórficos (*P. brasiliensis* e *P. marneffei*) e *C.albicans*. Em *C. albicans*, a concentração relativamente baixa de glicose como aquelas encontradas na corrente sanguínea são suficientes para inibir a expressão de genes do ciclo do glioxilato (Barelle *et al.*, 2006). Dessa maneira, *C. albicans* reprograma o seu metabolismo de carbono de um ciclo do glioxilato ativado durante a fase inicial de infecção em macrófagos para ativação da glicólise durante a progressão para uma infecção sistêmica (Lorenz *et al.*, 2004; Barelle *et al.*, 2006). Apesar de *P. brasiliensis* e *P. marneffei* causarem uma infecção primariamente pulmonar, a sua disseminação para outros órgãos é bastante comum. Dessa maneira, as leveduras podem ser encontradas tanto em um ambiente intracelular ou extracelular. Considerando a hipótese de que *icl* de *P. brasiliensis* seja regulado pela temperatura e pela fonte de carbono, assim como demonstrado para *P. marneffei*, seria esperado que, em contraste com *C. albicans*, o ciclo do glioxilato permaneça ativado durante todo ciclo de infecção. Essas diferenças regulatórias provavelmente são conseqüências dos diferentes estilos de vida desses fungos (comensal/termodimórfico).

A indução de genes relacionados à biosíntese *de novo* de aminoácidos em resposta a fagocitose por neutrófilos e macrófagos é observada tanto para *C. albicans* como *C. neoformans* (Lorenz *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2005; Fradin *et al.*, 2005). Especificamente, genes envolvidos na biosíntese de metionina são induzidos em *C. albicans* em resposta ao contato com neutrófilos (Rubin-Bejerano *et al.*, 2003). De forma semelhante a esses relatos, identificamos que o ortólogo em *P. brasiliensis* do gene *metG*, o qual codifica para a enzima cistationina β-liase, teve sua expressão induzida em resposta a fagocitose por macrófagos murinos. A cistationina β-liase é uma proteína tetramérica com subunidades idênticas, cuja função fisiológica em plantas, bactérias e fungos é catalisar o penúltimo passo que precede a síntese de metionina por meio da

reação de eliminação α,β da cistationina gerando homocisteína, piruvato e amônia. Posteriormente, a homocisteína é metilada para a formação de metionina pela metionina sintase (Belfaiza *et al.* 1986; Grynberg *et al.*, 2001).

Além de ser crítico para a biossíntese de proteínas, a metionina na forma de S-adenosilmetionina (SAME) é requerida em três vias metabólicas essenciais: transmetilação, transulfuração e síntese de poliaminas (Lu, 2000). Na transmetilação, o grupo metil (-CH₃) de SAME é doado a uma grande variedade de moléculas incluindo DNA, fosfolipídios e proteínas. Assim, qualquer intervenção nessas reações pode afetar um grande número de processos celulares, desde a expressão gênica até a fluidez da membrana. Na transulfuração, o átomo de enxofre do SAME é convertido via uma série de passos enzimáticos para cisteína, o precursor da glutatona, a qual é um importante antioxidante celular. Na síntese de poliamina o SAME atua doando dois resíduos de propilamina. As poliaminas são compostos orgânicos com dois ou mais grupos amina e atuam como fatores de crescimento tanto em células de eucariontes como procariontes. Dessa forma, a biossíntese de metionina é de vital importância para a viabilidade de microorganismos. Em fungos, essa proposição tem sido validada pelo fato de que diversos compostos naturais com efeitos antifúngicos, incluindo o ácido 2-amino-5-hidroxi-4-oxopentanóico (Yamaguchi *et al.*, 1990) e azoxibacilina (Aoki *et al.*, 1994), têm como prováveis alvos enzimas importantes da via de produção de metionina. Ademais, a deleção de genes como *met3* e *met6*, os quais são requeridos para síntese de metionina resulta em avirulência de *C. neoformans* em um modelo de infecção por via inalatória em camundongos (Yang *et al.*, 2002; Pascon *et al.*, 2004). Especificamente, *met6* codifica para a enzima metionina sintase e seu mutante nulo em *C. neoformans*, além de ser avirulento, tem um severo defeito no crescimento e é deficiente na produção da cápsula. Além disso, a não atividade da MET6 permite o acúmulo de homocisteína, um metabólito intermediário tóxico que inibe a biossíntese de esterol. Com relação a cistationina β -liase, a importância de sua atividade catalítica na interação patógeno-hospedeiro é reportada em um modelo murino sistêmico de infecção com *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Isolados dessa bactéria geneticamente deficientes para o gene *metG* são menos virulentos que a bactéria do tipo selvagem (Ejim *et al.*, 2004). Nesse sentido, a indução da expressão de *metG* poderia conferir uma importante resposta adaptativa de *P. brasiliensis* ao interior dos macrófagos, onde as concentrações de aminoácidos são relativamente baixas (Rubin-Bejerano *et al.*, 2003). Considerando as informações acima, inibidores específicos da síntese da metionina são importantes candidatos para drogas antifúngicas, pois teriam um impacto na

síntese de DNA e proteína simultaneamente. Ademais, muitos dos passos dessa via estão ausentes em mamíferos, diminuindo a ocorrência de efeitos colaterais tóxicos não desejados. Nesse sentido, Ejim *et al.* (2007) avaliaram, a partir de uma biblioteca de moléculas, potenciais inibidores da atividade da cistationina β -liase de bactérias e *C. albicans*. Os autores identificaram diversos compostos que inibiam a atividade da enzima *in vitro*, fornecendo uma expectativa do surgimento de uma nova classe de antimicrobianos.

O gene que codifica para formamidase (*pbfmd*) foi outro gene relacionado ao metabolismo que foi diferencialmente expresso no interior dos macrófagos. Análises por northern blot e o transcriptoma de *P. brasiliensis* mostram que os níveis do transcrito *pbfmd* são elevados na forma de micélio quando comparado à levedura, sugerindo um importante papel da formamidase na fase saprófita de *P. brasiliensis* (Borges *et al.*, 2005; Felipe *et al.*, 2005). Foi sugerido que a formamidase estaria envolvido no metabolismo de nitrogênio por meio da sua atividade catalítica que age hidrolisando de forma específica a formamida produzindo amônia e formato (Hynes, 1975). A amônia pode então ser usada como fonte de nitrogênio. Os resultados do presente trabalho mostraram uma acentuada repressão do gene *pbfmd* quando a levedura do fungo encontrava-se internalizada em comparação àquela crescida *in vitro*. O entendimento dos sinais que induziram tal diminuição dos níveis do transcrito *pbfmd* e a relevância desse aspecto na capacidade do *P. brasiliensis* sobreviver intracelularmente ainda é obscuro.

7.2. Genes relacionados à construção da parede celular

De particular interesse nos estudos de patogênese de *P. brasiliensis* estão os genes envolvidos na síntese de polissacarídeos da parede celular. A composição da parede celular de *P. brasiliensis* varia de acordo com a fase morfológica do fungo (Kanetsuna *et al.*, 1970). Considerando os polissacarídeos, a transição da forma de micélio para levedura é caracterizada pela alteração das ligações glicosídicas de polímeros de glicose, arranjos somente na forma de β -1,3-glicana no micélio e principalmente como α -1,3-glicana na levedura (San-Blas & San-Blas, 1977). No presente estudo, o gene que codifica para β -glicana sintase (*fks*) foi reprimido em resposta ao ambiente do macrófago e teve seu perfil de expressão confirmado por RT-PCR em tempo real. É reconhecido não somente para *P. brasiliensis* (Hallak *et al.*, 1982; Figueiredo *et al.*, 1993), mas também para *B. dermatitidis* (Hogan *et al.*, 1994) e *H. capsulatum* (Klimpel *et al.*, 1988), que a virulência de diferentes isolados na infecção experimental pulmonar de

camundongos está associada à quantidade relativa de α - e β -glicana presente na parede celular da forma de levedura desses fungos, de tal maneira que a parede celular de isolados avirulentos contém uma maior quantidade de β -glicana em detrimento da α -glicana. O mecanismo molecular responsável por esse processo tem sido intensamente investigado no contexto da relação fungo-macrófago. Assim como para os outros fungos dimórficos, a α -glicana em *H. capsulatum* está localizada na camada mais externa da parede celular (Kanetsuna & Carbonell, 1970; San-Blas, 1985; Rappleye *et al.*, 2007), o que previne o reconhecimento pelos macrófagos, via receptor dectina-1, da porção da parede fúngica formada por β -glicana (Brown & Gordon, 2003; Rappleye *et al.*, 2007). Com o silenciamento do gene que codifica para α -glicana sintase, as leveduras de *H. capsulatum* tornaram-se susceptíveis a destruição *in vitro* por macrófagos e sua virulência estava bastante comprometida em modelo de infecção pulmonar de camundongos (Rappleye *et al.*, 2004). A explicação para esses resultados provavelmente reside no efeito imunomodulador da β -glicana, pois diversos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que esse carboidrato na sua forma particulada (zymosan) ou purificada de alta massa molecular ativa diretamente macrófagos, estimulando sua capacidade fagocítica e antimicrobica, incluindo principalmente a produção de RIOS via NADPH oxidase. Ademais, a β -glicana induz a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como, IL-1 β , IL-8, IL-6 e TNF- α (Czop, 1986; Abel & Czop, 1992; Williams *et al.*, 1996). Especificamente, a fração polissacarídica F1 da parede celular de *P. brasiliensis*, o componente da qual a β -glicana é obtida, elícita a produção de TNF- α por macrófagos murinos e humanos (Figueiredo *et al.*, 1993; Anjos *et al.*, 2002), o que explicaria a capacidade da β -glicana em induzir a migração e organização concêntrica de neutrófilos e macrófagos no foco inflamatório para formação do granuloma *in vivo* e posterior proteção contra a infecção (Silva *et al.*, 1994). Além disso, a administração intravenosa de β -glicana beneficia pacientes com PCM tratados com drogas anti-fúngicas. Pacientes que receberam esse carboidrato, apesar de apresentarem uma forma mais severa da infecção, tiveram uma resposta mais intensa e favorável à terapia quando comparados com aqueles pacientes apenas tratados com os antifúngicos. Analisando diferentes parâmetros imunológicos, como o TNF- α presente no soro, os autores concluíram que o tratamento com a β -glicana claramente melhora a resposta imunológica. Ademais, nenhum efeito colateral foi observado após o tratamento intravenoso com esse carboidrato (Meira *et al.*, 1996). Assim, considerando o fato de TNF- α ser uma citocina crítica envolvida na formação do granuloma, na ativação de macrófagos e por estar associada à resistência ao *P. brasiliensis* (Calich *et al.*, 1998; Souto *et al.*, 2000; Calvi

et al., 2003), nossos resultados sugerem que os menores níveis do transcrito *fks*, que codifica para β -glicana-sintase, possa estar relacionado a um importante mecanismo adaptativo que esse fungo utiliza a fim de reduzir a resposta inflamatória elicitada pela β -glicana presente na sua parede. Tal mecanismo pode ainda estar envolvido com a reconhecida habilidade desse fungo em manter-se latente por um longo período de tempo no interior dos macrófagos do hospedeiro.

7.3. Genes relacionados ao estresse oxidativo

Após a fagocitose, macrófagos submetem os patógenos a um grupo de moléculas antimicrobianas incluindo os RIO e RIN, gerados pelo complexo NADPH oxidase e pela iNOS, respectivamente (Nathan *et al.*, 2000; Missal *et al.*, 2004). O mecanismo fungicida de macrófagos humanos e murinos contra o *P. brasiliensis* parece ser dependente dos RIN gerados pela iNOS, já que inibidores da atividade dessa enzima previne tal processo (Brummer *et al.*, 1989; Moscardi-Bacchi *et al.*, 1994; Bocca *et al.*, 1998). Além disso, camundongos geneticamente deficientes para o gene da iNOS são altamente susceptíveis à infecção por *P. brasiliensis* (Nascimento *et al.*, 2002). Por outro lado, o papel dos RIO na proteção do hospedeiro contra esse fungo parece não ser tão relevante. *P. brasiliensis* é altamente resistente a menadiona e H_2O_2 *in vitro* (Shaffner *et al.*, 1986; Dantas, 2005 e presente trabalho) e sobrevive em macrófagos e neutrófilos não ativados, onde os radicais de oxigênio deveriam ter um papel mais proeminente, já que a produção de RIN não é significativa nessas células (Brummer *et al.*, 1988a,b; Kurita *et al.*, 1999a,b; Calvi *et al.*, 2003). Nesse contexto, nossos dados mostrando a produção significativa de O_2^- e H_2O_2 por macrófagos infectados por *P. brasiliensis* corroboram a idéia de que um sistema adaptativo e eficiente de detoxificação atua nesse fungo contra os produtos gerados pela NADPH oxidase a fim de permitir sua sobrevivência no interior dessas células fagocíticas. De fato, os resultados gerados pelo experimento de microarranjo revelaram dois genes relacionados ao estresse oxidativo (*sod3* e *hsp60*), cujos transcritos tiveram seus níveis aumentados quando o fungo encontrava-se internalizado. Ademais, genes relacionados ao sistema de transporte de elétrons no citocromo, o qual é importante para defesa contra RIO, foram também induzidos.

O gene *sod3* codifica para uma provável SOD Cu,Zn, a qual é uma enzima envolvida na eliminação de radicais de ânion superóxido. A importância da SOD Cu,Zn na virulência fúngica foi recentemente avaliada. Células de *C. albicans* mutantes nulo para *sod1*, que codifica uma

SOD citoplasmática, são incapazes de sobreviver ao ataque fungicida de macrófagos e tem sua virulência atenuada em um modelo de infecção experimental (Hwang *et al.*, 2002). Posteriormente, resultados semelhantes foram obtidos em estudos realizados com *C. neoformans* var. *grubii* e *gattii* (Cox *et al.*, 2003; Narasipura *et al.*, 2003), onde a função do gene *sod1* mostrou-se necessária para virulência do fungo em camundongos infectados por via intranasal ou endovenosa. Esses resultados implicam a SOD na proteção contra os radicais de oxigênio produzidos pelo hospedeiro. Análises *in silico* mostram que a seqüência deduzida de aminoácidos codificada por *sod3* corresponde a uma SOD Cu,Zn, GPI-ancorada, com provável localização na membrana plasmática (Castro *et al.*, 2005), o que poderia conferir um melhor acesso aos radicais superóxido derivados dos macrófagos murinos e subsequentemente uma detoxificação mais rápida desse RIO. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que o gene *sod5*, também codificando uma SOD Cu,Zn GPI-ancorada, de *C. albicans* é induzido *in vitro* por moléculas geradoras de radicais de oxigênio e em resposta a internalização por neutrófilos (Fradin *et al.*, 2005; Martchenko *et al.*, 2004). Ademais, mutantes nulos para *sod5* são mais passíveis de destruição por neutrófilos e tem sua virulência atenuada em modelo experimental de candidíase sistêmica (Martchenko *et al.*, 2004). Nesse contexto, o aumento dos níveis do transcrito *sod3* de *P. brasiliensis* internalizados era esperado se o produto desse gene estivesse envolvido na defesa contra os radicais gerados pela NADPH oxidase dos macrófagos.

A indução da expressão de *sod3* observada no experimento onde *P. brasiliensis* foi tratado *in vitro* com altas concentrações de menadiona (50 mM), a qual leva a produção endógena de ânion superóxido, sugere um possível papel protetor adicional proporcionado pela enzima codificada por esse gene. A respiração mitocondrial é a principal fonte endógena de superóxido (Chance *et al.*, 1979), e fatores como fontes de carbono não passíveis de fermentação (acetato ou glicerol, por exemplo) estão ligadas ao aumento da produção de superóxido pela cadeia transportadora de elétrons em *C. albicans* (Rikhvanov *et al.*, 2002), *S. cerevisiae* (Davidson *et al.*, 1996; Longo *et al.*, 1996; Maris *et al.*, 2001) e em *Schizosaccharomyces pombe* (Jeong *et al.*, 2001). Considerando nossos resultados sobre a modulação de genes relacionados ao estresse nutricional apresentado pelo *P. brasiliensis* fagocitado, esses dados em conjunto fornecem evidências de que a SOD3 deve ser necessária para a eliminação de radicais superóxido gerados tanto exo como endogenamente, assim como demonstrado para SOD5 de *C. albicans* (Martchenko *et al.*, 2004). Outro importante fator que induz o aumento da produção endógena de radicais superóxido em patógenos intracelulares são os RIO e RIN exógenos

derivados dos macrófagos. Essas moléculas inibem a respiração celular por meio da modificação das proteínas da cadeia transportadora de elétrons (complexos I, II, III e IV) (Brown, 1999; Joseph-Horne *et al.*, 2001, Missal *et al.*, 2004). Quando a cadeia transportadora de elétrons (CTE) é inibida, os elétrons se acumulam nas fases iniciais (principalmente no complexo I), onde eles podem ser doados diretamente para o oxigênio molecular para gerar o radical superóxido de forma exacerbada (Cadenas & Davies, 2000). Dessa maneira, tem sido demonstrado que a exposição aos RIO e RIN pode induzir a expressão de genes que codificam enzimas detoxificadoras dessas moléculas, as próprias proteínas componentes dos complexos enzimáticos da CTE, ou ainda aquelas que atuam como chaperonas moleculares permitindo seu funcionamento (Cabiscol *et al.*, 2002; Akhter *et al.*, 2003; Lorenz *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2005; Missal *et al.*, 2004). De fato, observamos níveis de mRNA aumentados de *qcr8*, o qual codifica a ubiquinona citocromo *c* redutase do complexo III e de *cox17p* (e *hsp60*, ver adiante), uma chaperona transportadora de cobre essencial para a montagem e atividade catalítica da citocromo *c* oxidase (complexo IV) (Glerum *et al.*, 1996; Punter & Glerum, 2003).

Além dos maiores níveis de mRNA *sod3* pelo tratamento *in vitro* do fungo com menadiona, mostramos também o acúmulo desse transcrito quando o fungo é desafiado *in vitro* com H₂O₂. Essa molécula reativa também induz a expressão de genes codificando SOD em outros fungos (Gash *et al.*, 2000, Lamarre *et al.*, 2001), sendo sugerido, assim como para diversas bactérias, que a indução da atividade de SOD protege as células desse radical de oxigênio, mesmo não sendo o peróxido de hidrogênio substrato para essa enzima (Carlioz *et al.*, 1986; Bruno-Barcena *et al.*, 2004). O mecanismo de proteção de SOD contra H₂O₂ está relacionado à prevenção da redução de ferro férrico (Fe⁺³) para ferro ferroso (Fe⁺²) dependente de O₂⁻. O ferro ferroso reage com H₂O₂ gerando, via reação de Fenton, radicais hidroxila OH· altamente tóxicos (Babior, 2000, Missal *et al.*, 2004). Nesse contexto, acreditamos que o aumento da expressão de *sod3* em resposta ao tratamento por H₂O₂ possa ser um outro mecanismo importante de adaptação ao ambiente de estresse oxidativo encontrado pelo fungo quando internalizado pelo macrófago. Como mencionado acima o peróxido de hidrogênio não é substrato para essa enzima, e sim um de seus produtos. Dessa maneira, um aumento da atividade da SOD Cu,Zn, seja induzido por H₂O₂ e/ou O₂⁻, produziria uma maior concentração endógena do primeiro. Assim, ao contrário do observado poderíamos esperar que genes codificando catalases e outras enzimas detoxificadoras de H₂O₂, como a citocromo-*c* peroxidase (CcP), tivessem sua expressão aumentada em *P. brasiliensis* fagocitado. Essa aparente contradição pode

ser explicada pelo fato das duas enzimas citadas já possuírem uma elevada atividade específica basal na forma de levedura desse fungo *in vitro*. Especificamente, a atividade basal de catalase em *P. brasiliensis* é 5 e 2100 vezes maior quando comparado com *C. albicans* e *S. cerevisiae*, respectivamente (Dantas, 2005). Ademais, a catalase e a CcP respondem rapidamente a baixas e altas concentrações de peróxido, conferindo uma alta resistência a esse radical de oxigênio. Interessantemente, nosso grupo identificou, clonou e caracterizou uma catalase peroxissomal de *P. brasiliensis* (Moreira *et al.*, 2004). A proteína e os níveis do mRNA aumentavam durante a transição da forma saprófita de micélio para a parasita de levedura e também durante exposição *in vitro* ao H₂O₂, sugerindo um papel potencial dessa enzima na virulência de *P. brasiliensis*. Esses dados estão de acordo com a proposição de que uma das diferenças básicas entre os fungos patogênicos primários e os oportunistas é a resistência natural aos radicais de oxigênio (Shaffner *et al.*, 1986).

Proteínas de choque térmico (HSPs) são uma família altamente conservada de proteínas que atuam nas células em condições normais ou de estresse. Entre as HSPs, existem aquelas responsáveis pela translocação e enovelamento de proteínas, as quais recebem o nome de chaperonas moleculares e são essenciais para virtualmente todos os organismos. A proteína HSP60 de *S. cerevisiae*, homóloga a GroEL procariota, é uma dessas chaperonas moleculares essenciais à viabilidade celular, a qual promove o correto enovelamento de diversas pré-proteínas translocadas para a matriz mitocondrial (Bukau *et al.*, 1998). A HSP60 é uma ATPase que interage de forma não covalente com as proteínas substratos reconhecendo regiões hidrofóbicas expostas em suas superfícies, devido ao enovelamento parcial incorreto. Com essa interação, a HSP60 fornece um ambiente que facilita o correto re-enovelamento. Essa ação previne o desenvolvimento de formas inativas ou agregação irreversível dessas proteínas transportadas para a mitocôndria (Cheng *et al.*, 1989; Walter & Buchner, 2002). As chaperonas são importantes em condições celulares normais e em condições de estresse (choque térmico, depleção de glicose ou exposição a radicais oxidativos entre outros) ocorre um aumento significativo de sua expressão (Cheng *et al.*, 1989; Godon *et al.*, 1998). Tal indução reflete uma necessidade aumentada dessas chaperonas, pois todas essas situações de estresse podem afetar diversas proteínas levando a desnaturação, enovelamento incorreto, desenovelamento parcial ou agregação irreversível (Riezman, 2004). Nesse contexto, a expressão diferencial das chaperonas HSP60 e HSP70 na forma de levedura de *P. brasiliensis* é compatível com o seu crescimento a 37°C (da Silva *et al.*, 1999; Salem-Izacc *et al.*, 2001). Ademais, o número de ESTs

representando chaperonas na biblioteca de cDNA da forma de levedura desse fungo é 38% maior quando comparado com a de micélio (Felipe *et al.*, 2005; Nicola *et al.*, 2005). Steen *et al.* (2002) também identificaram um aumento nos níveis dos transcritos da HSP60 e HSP70 quando *C. neoformans* cresce a 37°C.

O estresse oxidativo é outra condição na qual há uma indução na expressão de HSPs. O tratamento *in vitro* de *S. cerevisiae* com peróxido de hidrogênio induz diversas HSPs, entre elas a HSP104 e HSP12 (Godon *et al.*, 1998). Outras HSPs têm sido diretamente associadas a resistência ao estresse oxidativo como HSP70 citoplasmática, a qual é altamente induzível, e a HSP33 bacteriana (Toledano *et al.*, 1998; Jakob *et al.*, 1999). A fim de avaliar o papel da HSP60 de *S. cerevisiae* em resposta ao estresse oxidativo gerado pelo peróxido de hidrogênio e menadiona, Cabiscol *et al.* (2002) construíram linhagens mutantes condicionais, cujos genes *hsp60* estavam sob o controle do promotor *tet* regulado por doxiciclina. Assim, era possível obter leveduras produzindo diversas quantidades da proteína HSP60 ajustando o tempo e a concentração da doxiciclina no tratamento. Aqueles mutantes produzindo baixos níveis protéicos de HSP60 mostraram-se com elevada sensibilidade (redução da viabilidade celular) aos agentes oxidantes e níveis aumentados de enzimas mitocondriais oxidadas como a aconitase e succinato desidrogenase. Ademais, um aumento intracelular nos níveis de RIO foi observado, após o tratamento desses isolados. Por outro lado, leveduras apresentando níveis elevados de HSP60 foram mais resistentes tanto ao tratamento com menadiona quanto com peróxido de hidrogênio. O papel protetor da HSP60 foi relacionado à sua habilidade de se ligar as enzimas mitocondriais desnoveladas parcialmente, devido ao dano oxidativo, protegendo sua integridade e limitando a liberação de íons de ferro ferroso originados da oxidação de centros ferro-enxofre $[4Fe-4S]^{2+}$ dessas enzimas. De fato, o tratamento com o quelante de ferro deferoxamina protegeu os mutantes com níveis baixos de HSP60 da morte induzida pelos radicais oxidantes. Nesse contexto, sugerimos que o aumento significativo da produção do radical superóxido e peróxido de hidrogênio por macrófagos infectados com *P. brasiliensis* levou a maiores níveis do transcrito *hsp60* no fungo (como confirmado por RT-PCR em tempo real), cujo produto protéico poderia proteger enzimas mitocondriais vitais da oxidação. Dessa forma, a liberação de ferro ferroso e a produção de radicais hidroxila tóxicos, via reação de Fenton, estariam inibidas. Condizente com a importância da HSP60 na resposta contra os RIO em *S. cerevisiae*, diversos patógenos bacterianos intracelulares aumentam o nível do transcrito de seu homólogo *GroEL* quando no interior de macrófagos. Esse gene foi um dos que tiveram a maior indução da expressão durante

infecção da linhagem murina de macrófagos P388DA por *L. monocytogenes* (Chatterjee *et al.*, 2006). Interessantemente, a indução de GroEL se deu somente quando essa bactéria encontrava-se no fagossomo e não quando escapava para o citoplasma, sugerindo que o requerimento para essa proteína dependia de fatores encontrados somente no fagossomo, como o estresse oxidativo. *Rodococcus equi*, um patógeno intracelular facultativo de eqüinos, aumenta a expressão de GroEL não só quando no interior de macrófagos mas também durante tratamento *in vitro* com 50 mM de peróxido de hidrogênio (Rahman *et al.*, 2005) e *M. tuberculosis* ativa GroEL quando fagocitado por macrófagos murinos e humanos (Alavi & Affronti, 1994; Lee & Horwitz, 1995; Monahan *et al.*, 2001). Em conjunto, esses dados sugerem uma estratégia conservada (utilização de GroEL/HSP60) entre bactérias e fungos para a sobrevivência intracelular em macrófagos. Além de seu papel essencial de chaperona, a HSP60 é reconhecida como importante molécula imunomodulatória. A HSP60 atua como importante imunógeno em diversos fungos, de tal modo que a vacinação empregando a HSP60 recombinante de *H. capsulatum* induz uma resposta imune celular protetora em camundongos infectados com doses sub-letais desse patógeno (Deepe & Gibbons, 2002). Ademais, a HSP60 de *C. immitis* induz proliferação de linfócitos T isolados de linfonodos de camundongos imunizados (Thomas *et al.*, 1997). De forma interessante, as HSP60 de *H. capsulatum* e *C. immitis* foram imunolocalizadas na parede celular, e pelo menos no primeiro, essa proteína atua como um ligante (PAMP) do receptor CR3 de macrófagos (Long *et al.*, 2003). Cunha *et al.* (2002) mostraram que a HSP60 é também um importante imunógeno em *P. brasiliensis*, pois essa molécula na forma recombinante é reconhecida por anticorpos de 91% de pacientes com PCM.

Outras HSPs de *P. brasiliensis* também parecem ser importantes na capacidade desse fungo em causar doença. A fim de mimetizar a via hematogênica de disseminação fúngica, Bailão *et al.* (2006) avaliaram a expressão gênica diferencial de *P. brasiliensis* quando incubado *in vitro* na presença de sangue total humano. Após 60 minutos de tratamento um dos mais abundantes transcrito era aquele que codificava para a HSP70. Além disso, os transcritos dos genes *hsp30* e *hsp90* também estavam representados. Esses resultados sugerem que *P. brasiliensis* necessita para sua sobrevivência determinadas HSPs, tanto no seu estilo de vida intra como extracelular.

7.4. Considerações finais e perspectivas

No intuito de obter uma maior compreensão da complexa interação *P. brasiliensis*-macrófagos, recentemente nosso grupo também utilizando a tecnologia de microarranjos de DNA avaliou a resposta transcricional de macrófagos murinos peritoneais infectados por *P. brasiliensis* durante 6, 24 e 48 horas (Silva *et al.*, - submetido – Anexo 6). Vale ressaltar que os experimentos de infecção do referido trabalho foi realizado concomitantemente com os descritos aqui, de tal maneira que no ponto de 6 horas após a infecção *ex vivo* dos macrófagos foi possível vislumbrar um modelo de interação onde o fungo induziu o macrófago a acumular transcritos de genes relacionados à atividade pró-inflamatória e de fagocitose. Ao mesmo tempo, o *P. brasiliensis*, como observado, regulava genes relacionados ao estresse imposto pelo ambiente do fagócito.

Os dados descritos no presente trabalho demonstram, pela primeira vez, a contribuição da técnica de microarranjo como um método robusto para avaliar simultaneamente os níveis de mRNA de mais de 1000 genes do patógeno *P. brasiliensis* diretamente recuperados do interior de macrófagos. A premissa inicial de todo experimento de microarranjo é que as mudanças da expressão gênica medida pelas diferenças nos níveis de transcritos entre a condição experimental e controle, são biologicamente relevantes. Assim, é previsto que os genes induzidos em *P. brasiliensis* durante a infecção de macrófagos são potencialmente importantes para a sua sobrevivência intracelular. Dessa maneira, a inativação ou deleção desses genes reduziria a capacidade desse patógeno sobreviver e se multiplicar *in vivo*. Os genes diferencialmente expressos identificados nesse trabalho são então potenciais alvos de estudos moleculares de virulência usando o modelo experimental murino de infecção. Devido à complexa natureza genética do fungo *P. brasiliensis*, somente recentemente parte das ferramentas moleculares necessárias para realização de tais estudos tornaram-se disponíveis (Leal *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2005). Essas ferramentas podem em um futuro próximo revelar alguns segredos desse importante patógeno fúngico.

Porém, é essencial ressaltar que há limitações na interpretação de dados gerados por todos experimentos de microarranjo de DNA. A maioria dos estudos que se utilizam dessa técnica assume, de forma implícita, uma simples relação entre transcrição e tradução, ou seja, os níveis de mRNA necessariamente reflete os níveis de suas respectivas proteínas. Em fungos, e

especificamente em *S. cerevisiae* diversos trabalhos têm mostrado que tal simples relação não é verdadeira. A avaliação do coeficiente de correlação (r) entre os níveis de mRNA e abundância de proteína mostra que em alguns casos há uma correlação positiva, porém frequentemente a correlação é fraca ou ainda ocorre uma correlação negativa. Por exemplo, Gygi *et al.* (1999) comparou os níveis protéicos avaliados por eletroforese bidimensional com os níveis de mRNA calculados a partir de um experimento de SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) e reportou um r de 0,93 para um conjunto de 106 genes. Entretanto, essa alta correlação foi significativamente tendenciosa, pois incorporou um pequeno número de genes com altos níveis de mRNA. Quando tal viés foi removido, a correlação foi reduzida para 0,35. Estudos subsequentes usando microarranjos de cDNA e cromatografia líquida e espectrometria de massa identificaram 289 proteínas com um r moderado de 0,61 (Ideker *et al.*, 2001). Por sua vez, Griffin *et al.* 2002 encontraram um r de 0,21 quando comparou a abundância relativa de 245 proteínas com as de mRNA. Entretanto, coeficientes mais significativos foram encontrados para as proteínas que faziam parte via glicolítica ou da utilização de galactose. Em um estudo bastante abrangente, Beyer *et al.* (2004), utilizando os bancos de dados de 30 trabalhos de microarranjo de oligonucleotídeos e 2 de proteoma de *S. cerevisiae* crescido em meio YPD (geralmente usados nos experimentos como controles) calcularam o coeficiente de correlação de 1669 ORFs entre os níveis de mRNA e abundância protéica. Para a célula como um todo o r foi de 0,580. Ademais, quando era considerado a localização e função das proteínas, a correlação mRNA-proteína na maioria dos compartimentos celulares era relativamente baixo ($r < 0,4$), enquanto que nos módulos funcionais as correlações revelavam-se geralmente mais altas. De fato, os módulos funcionais metabolismo, energia e síntese protéica exibem as correlações mais altas entre níveis de mRNA e proteína (média de 0,630, 0,580 e 0,76 respectivamente) sugerindo que esses módulos são principalmente regulados em nível transcricional. Interessantemente, o coeficiente de correlação do módulo funcional relacionado à defesa/proteção celular e virulência foi de 0,5. Há várias explicações para a não relação direta mRNA-proteína: (i) modificações pós-transcricionais que controlam a taxa de tradução (ii) regulação traducional e (iii) degradação diferencial de mRNA e proteínas. Além disso, mecanismos de retroalimentação existem de tal maneira que uma proteína que sofre uma acelerada degradação pode levar a um aumento da tradução acarretando em uma correlação negativa entre mRNA e proteína (Greenbaum *et al.*, 2003).

O presente trabalho é pioneiro e fornece um passo inicial para diversas novas investigações biológicas visando melhor entender a interação molecular entre *P. brasiliensis* e o macrófago, a principal célula do hospedeiro que regula a patogenicidade na PCM.

8. REFERÊNCIAS

- Abel, G., J. K. Czop.** 1992. Stimulation of human monocyte β -glucan receptors by glucan particles induces production of TNF- α and IL-1 β . *Int. J. Immunopharmacol.* **14**:1363-1373.
- Aguirre, K., E. A. Havell, G. W. Gibson, L. L. Johnson.** 1995. Role of tumor necrosis factor and gamma interferon in acquired resistance to *Cryptococcus neoformans* in the central nervous system of mice. *Infect Immun.* **63**:1725-1731.
- Akhter, S., H. C. McDade, J. M. Gorlach, G. Heinrich, G. M. Cox, J. R. Perfect.** 2003. Role of alternative oxidase gene in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **71**:5794-5802.
- Alavi, M. R., L. F. Affronti.** 1994. Induction of mycobacterial proteins during phagocytosis and heat shock: a time interval analysis. *J. Leukoc. Biol.* **55**:633-641.
- Albina, J. E., S. Cui, R. B. Mateo, J. S. Reichner.** 1993. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **150**:5080-5085.
- Albuquerque, P., C. M. Kyaw, R. R. Saldanha, M. M. Brigido, M. S. S. Felipe, I. Silva-Pereira.** 2004. Pbhyd1 and Pbhyd2: two mycelium specific hydrophobin genes from the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet. Biol.* **41**:510-520.
- Allendoerfer, R., G. S. Deepe Jr.** 1997. Intrapulmonary response to *Histoplasma capsulatum* in gamma interferon knockout mice. *Infect. Immun.* **65**:2564-2569.
- Allendoerfer, R., G. S. Jr. Deepe.** 1998. Blockade of endogenous TNF-alpha exacerbates primary and secondary pulmonary histoplasmosis by differential mechanisms. *J. Immunol.* **160**:6072-6082.
- Almeida, A. J., D. R. Matute, J. A. Carmona, M. Martins, I. Torres, J. G. McEwen, A. Restrepo, C. Leao, P. Ludovico, F. Rodrigues.** 2007. Genome size and ploidy of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals a haploid DNA content: flow cytometry and GP43 sequence analysis. *Fungal Genet. Biol.* **44**:25-31.
- Almeida, F. P.** 1930. Estudos comparativos do granuloma coccidioídico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasita brasileiro. *Ann. Fac. Med. Sao Paulo* **5**:125-141.
- Almeida, S. R., C. S. Unterkircher, Z. P. Camargo.** 1998. Involvement of the major glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in attachment to macrophages. *Med. Mycol.* **36**:405-411.

Almeida, S. R., J. D. Lopes. 2001. The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **34**:529-537.

Amer, A. O., M. S. Swanson. 2002. A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**:56-61.

Andrade, R. V. 2006. Análise do transcriptoma e da expressão diferencial de genes de micélio e levedura de *Paracoccidioides brasiliensis*. Tese de doutorado. Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil.

Anjos, A. R., S. A. Calvi, R. Ferracini, M. T. Peracoli, C. L. Silva, A. M. Soares. 2002. Role of *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall fraction containing beta-glucan in tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes: correlation with fungicidal activity. *Med. Mycol.* **40**:377-382.

Aoki, Y., M. Kondoh, M. Nakamura, T. Fujii, T. Yamazaki, H. Shimada, M. Arisawa. 1994. A new methionine antagonist that has antifungal activity: mode of action. *J. Antibiot. (Tokyo).* **47**:909-916.

Aristizabal, B. H., V. C. Karl, A. S. David, A. Restrepo. 1998. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. *Infect. Immun.* **66**: 5587-5591.

Babior, B. M. 2000. Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.* **109**:33-44.

Bagagli, E., A. Sano, K. I. Coelho, S. Alquati, M. Miyaji, Z. P. de Camargo, G. M. Gomes, M. Franco, M. R. Montenegro. 1998. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg. Apr.* **58**:505-512.

Bagagli, E., M. Franco, S. M. Bosco, F. Hebeler-Barbosa, L. A. Trinca, M. R. Montenegro. 2003. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med. Mycol.* **41**:217-223.

Bailão, A. M., A. Schrank, C. L. Borges, V. Dutra, E. E. Walquiria Ines Molinari-Madlum, M. S. Soares Felipe, M. J. Soares Mendes-Giannini, W. S. Martins, M. Pereira, C. Maria de Almeida Soares. 2006. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microbes Infect.* **8**:2686-2697.

Barbosa, M. S., D. A. Passos Cunha, M. S. S. Felipe, R. S. A. Jesuino, Pereira, M. C. M. A. Soares. 2004. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homologue is differentially regulated in phases of *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular and phylogenetic analysis. *Fungal Genet. Biol.* **41**:667-675.

- Barelle, C. J., C. L. Priest, D. M. Maccallum, N. A. Gow, F. C. Odds, A. J. Brown.** 2006. Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. *Cell Microbiol.* **8**:961-971.
- Battistoni, A., G. Donnarumma, R. Greco, P. Valenti, G. Rotilio.** 1998. Overexpression of a hydrogen peroxide-resistant periplasmic Cu, Zn superoxide dismutase protects *Escherichia coli* from macrophage killing. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **243**:804-807.
- Bava, A. J., A. S. Mistchenko, M. F. Palacios, M. E. Estevez, N. I. Tiraboschi, L., Negroni, R., R. A. Diez.** 1991. Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients. *Microbiol. Immunol.* **35**: 167-74.
- Beaman, L.** 1991. Effects of recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor on *in vitro* interactions of human mononuclear phagocytes with *Coccidioides immitis*. *Infect Immun.* **59**:4227-4239.
- Belfaiza, J., C. Parsot, A. Martel, C. B. de la Tour, D. Margarita, G. N. Cohen, I. Saint-Girons.** 1986. Evolution in biosynthetic pathways: two enzymes catalyzing consecutive steps in methionine biosynthesis originate from a common ancestor and possess a similar regulatory region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**:867-871.
- Bellocchio, S., C. Montagnoli, S. Bozza, R. Gaziano, G. Rossi, S. S. Mambula, A. Vecchi, A. Mantovani, S. M. Levitz, L. Romani.** 2004. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens *in vivo*. *J. Immunol.* **172**:3059-3069.
- Benard, G., C. C. Romano, C. R. Cacere, M. Juvenale, M. J. Mendes-Giannini, A. J. Duarte.** 2001. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* **13**:248-252.
- Benard, G., M. A. Hong, G. M. Del Negro, L. Batista, M. A. Shikanai-Yasuda, A. J. Duarte.** 1996. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **54**:7-12.
- Benard, G., M. J. Mendes-Giannini, M. Juvenale, E. T. Miranda, A. J. Duarte.** 1997. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *J. Infect. Dis.* **175**:1263-1267.
- Berendji, D., V. Kolb-Bachofen, P. F. Zipfel, C. Skerka, C. Carlberg, K. D. Kroncke.** 1999. ZINC finger transcription factors as molecular targets for nitric oxide-mediated immunosuppression: inhibition of IL-2 gene expression in murine lymphocytes. *Mol. Med.* **5**:721-730.
- Berlett, B. S., E. R. Stadtman.** 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **272**:20313–20316.

- Beron, W., C. Alvarez-Dominguez, L. Mayorga, P. D. Stahl.** 1995. Membrane trafficking along the phagocytic pathway. *Trends Cell Biol.* **5**:100-104.
- Betz, M., B. S. Fox.** 1991. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not Th2 lymphokines. *J. Immunol.* **146**:108-113.
- Beyer, A., J. Hollunder, H. P. Nasheuer, T. Wilhelm.** 2004. Post-transcriptional expression regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on a genomic scale. *Mol. Cell Proteomics.* **3**:1083-1092.
- Bialek, R., A. Ibricevic, A. Fothergill, D. Begerow.** 2000. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3190-3193.
- Biondo, C., A. Midiri, L. Messina, F. Tomasello, G. Garufi, M. R. Catania, M. Bombaci, C. Beninati, G. Teti, G. Mancuso.** 2005. MyD88 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense against *Cryptococcus neoformans*. *Eur. J. Immunol.* **35**:870-878.
- Blasi, E., L. Pitzurra, M. Puliti, A. R. Chimienti, R. Mazzolla, R. Barluzzi, F. Bistoni.** 1995. Differential susceptibility of yeast and hyphal forms of *Candida albicans* to macrophage-derived nitrogen-containing compounds. *Infect. Immun.* **63**:1806-1809.
- Bocca, A. L., E. E. Hayashi, A. G. Pinheiro, A. B. Furlanetto, A. P. Campanelli, F. Q. Cunha, F. Figueiredo.** 1998. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. *J. Immunol.* **161**:3056-3063.
- Bocca, A. L., M. F. Silva, C. L. Silva, F. Q. Cunha, F. Figueiredo.** 1999. Macrophage expression of class II major histocompatibility complex gene products in *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **61**:280-287.
- Bogdan, C. M. Rollinghoff, A. Diefenbach.** 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **12**:64-76.
- Bordon, A. P., L. A. Dias-Melicio, M. J. Acorci, G. A. Biondo, D. Fecchio, M. T. Peracoli, A. M. de Soares.** 2007a. Prostaglandin E(2) production by high and low virulent strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia.* **163**:129-135.
- Bordon, A. P., L. A. Dias-Melicio, M. J. G. A. Acorci, D. Biondo, M. T. Fecchio, A. M. de Soares Peracoli.** 2007b. Prostaglandin E(2) inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human monocytes. *Microbes Infect.* **9**:744-747.
- Borges, C. L., M. Pereira, M. S. Felipe, F. P. de Faria, F. J. Gomez, G. S. Deepe Jr., C. M. Soares.** 2005. The antigenic and catalytically active formamidase of *Paracoccidioides brasiliensis*: protein characterization, cDNA and gene cloning, heterologous expression and functional analysis of the recombinant protein. *Microbes Infect.* **7**:66-77.

- Bozza, S., R. Gaziano, A. Spreca, A. Bacci, C. Montagnoli, di P. Francesco, L. Romani.** 2002. Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J. Immunol.* **168**:1362-1371.
- Bozzi, A., P. P. Pereira, B. S. Reis, M. I. Goulart, M. C. Pereira, E. P. Pedroso, M. F. Leite, A. M. Goes.** 2006. Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha single nucleotide gene polymorphism frequency in paracoccidioidomycosis. *Hum. Immunol.* **67**:931-939.
- Brito, C., M. Naviliat, A. C. Tiscornia, F. Vuillier, G. Gualco, G. Dighiero, R. Radi, A. M. Cayota.** 1999. Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J. Immunol.* **162**:3356-3366.
- Brown, G. C., V. Borutaite.** 1999. Nitric oxide, cytochrome *c* and mitochondria. *Biochem. Soc. Symp.* **66**:17-25.
- Brown, G. D.,** 2006. Macrophage receptors and innate immunity: insights from dectin-1. *Novartis Found. Symp.* **279**:114-23.
- Brown, G. D., S. Gordon.** 2003. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity.* **19**:311-315.
- Brummer, E., Castaneda, E.; Restrepo, A.** 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev.*, **6**: 89-117.
- Brummer, E., L. H. Hanson, A. Restrepo, D. A. Stevens.** 1988b. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. *J. Immunol.* **140**:2786-2789.
- Brummer, E., L. H. Hanson, A. Restrepo, D. A. Stevens.** 1989. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect. Immun.* **57**:2289-2294.
- Brummer, E., L. H. Hanson, D. A. Stevens.** 1988a. Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. *Int. J. Immunopharmacol.* **10**:945-952.
- Brummer, E., N. Kurita, S. Yoshida, K. Nishimura, M. Miyaji.** 1991. Killing of *Histoplasma capsulatum* by gamma-interferon-activated human monocyte-derived macrophages: evidence for superoxide anion dependent mechanism. *J. Med. Microbiol.* **35**:29-34.
- Brummer, E., S. H. Sun, J. L. Harrison, A. M. Perlman, D. E. Philpott, D. A. Stevens.** 1990. Ultrastructure of phagocytosed *Paracoccidioides brasiliensis* in nonactivated or activated macrophages. *Infect. Immun.* **58**:2628-2636.

- Bruno-Barcena, J. M., J. M. Andrus, S. L. Libby, T. R. Klaenhammer, H. M. Hassan.** 2004. Expression of a heterologous manganese superoxide dismutase gene in intestinal lactobacilli provides protection against hydrogen peroxide toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4702-10.
- Bryk, R., P. Griffin, C. Nathan.** 2000. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature.* **407**:211-215.
- Bukau, B., A. L. Horwich.** 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell.* **92**:351-366.
- Cabiscol, E., G. Belli, J. Tamarit, P. Echave, E. Herrero, J. Ros.** 2002. Mitochondrial Hsp60, resistance to oxidative stress, and the labile iron pool are closely connected in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**:44531-44538.
- Cadavid, D., A. Restrepo.** 1993. Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia. *Epidemiol. Infect.* **111**:121-33.
- Cadenas, E., K. J. Davies.** 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* **29**:222-230.
- Calich, V. L., E. Burger, S. S. Kashino, R. A. Fazioli, L. M. Singer-Vermes.** 1987. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice is controlled by a single dominant autosomal gene. *Infect. Immun.* **55**: 1919-1923.
- Calich, V. L., L. M. Singer-Vermes, A. M. Siqueira, E. Burger.** 1985. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br. J. Exp. Pathol.* **66**:585-594.
- Calich, V. L., S. S. Kashino.** 1998. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**:615-623.
- Calich, V. L., T. L. Kipnis, M. Mariano, C. F. Neto, W. D. Dias da Silva.** 1979. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis in vitro*: its opsonic effect and possible significance for an *in vivo* model of infection. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **12**:21-30.
- Calvi, S. A., M. T. Peracoli, R. P. Mendes, J. Marcondes-Machado, D. Fecchio, S. A. Marques, A. M. Soares.** 2003. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect.* **5**:107-113.
- Campanelli, A. P., G. A. Martins, J. T. Souto, M. S. Pereira, M. C. Livonesi, R. Martinez, J. S. Silva.** 2003. Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. *J. Infect. Dis.* **187**:1496-1505.
- Cano, L. E., B. Gomez, E. Brummer, A. Restrepo, D. A. Stevens.** 1994. Inhibitory effect of deferoxamine or macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferrin. *Infect. Immun.* **62**:1494-1496.

- Cano, L. E., E. Brummer, D. A Stevens, A. Restrepo.** 1992. Fate of conidia of *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by resident macrophages or cytokine-treated macrophages. *Infect. Immun.* **60**:2096-2100.
- Cano, L. E., L. M. Singer-Vermes, T. A. Costa, J. O. Mengel, C. F. Xidieh, C. Arruda, D. C. Andre, C. A. Vaz, E. Burger, V. L. Calich.** 2000. Depletion of CD8(+) T cells *in vivo* impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* **68**:352-359.
- Cano, L. E., S. S. Kashino, C. Arruda, D. Andre, C. F. Xidieh, L. M. Singer-Vermes, C. A Vaz, E. Burger, V. L. Calich.** 1998. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* **66**:800-806.
- Canovas, D., A. Andrianopoulos.** 2006. Developmental regulation of the glyoxylate cycle in the human pathogen *Penicillium marneffeii*. *Mol. Microbiol.* **62**:1725-1738.
- Carbonell, L. M.** 1969. Ultrastructure of dimorphic transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol.* **100**:1076-1082.
- Carlioz, A., D. Touati.** 1986. Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *EMBO J.* **5**:623-630.
- Carmo, J. P., L. A. Dias-Melicio, S. A. Calvi, M. T. Peracoli, A. M. Soares.** 2006. TNF-alpha activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. *Med. Mycol.* **44**:363-368.
- Casadevall, A., J. N. Steenbergen, J. D. Nosanchuk.** 2003. 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi--the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:332-337.
- Casadevall, A., L. A. Pirofski.** 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.* **67**:3703-3713.
- Casadevall, A., L. A. Pirofski.** 2000. Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect. Immun.* **68**:6511-6518.
- Castro, N. da S., Z. A. Maia, M. Pereira, C. M. Soares.** 2005. Screening for glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet. Mol. Res.* **4**:326-345.
- Cavassani, K. A., A. P. Campanelli, A. P. Moreira, J. O. Vancim, L. H. Vitali, R. C. Mamede, R. Martinez, J. S. Silva.** 2006. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. *J. Immunol.* **177**:5811-5818.
- Chance, B., B. Schoener, R. Oshino, F. Itshak, Y. Nakase.** 1979. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J. Biol. Chem.* **254**:4764-4771.

- Chang, Y. C., B. H. Segal, S. M. Holland, G. F. Miller, K. J. Kwon-Chung.** 1998. Virulence of catalase-deficient aspergillus nidulans in p47(phox)^{-/-} mice. Implications for fungal pathogenicity and host defense in chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* **101**:1843-1850.
- Chang, Y. C., K. J. Kwon-Chung.** 1994. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol. Cell Biol.* **14**:4912-4919.
- Chatterjee, S. S., H. Hossain, S. Otten, C. Kuenne, K. Kuchmina, S. Machata, E. Domann, T. Chakraborty, T. Hain.** 2006. Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **74**:1323-1338.
- Cheng, M. Y., F. U. Hartl, J. Martin, R. A. Pollock, F. Kalousek, W. Neupert, E. M. Hallberg, R. L. Hallberg, A. L. Horwich.** 1989. Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature.* **337**:620-625.
- Chensue, S. W.** 2001. Molecular machinations: chemokine signals in host-pathogen interactions. *Clin Microbiol Rev.* **14**:821-835.
- Chuaqui, R. F., R. F. Bonner, C. J. Best, J. W. Gillespie, M. J. Flaig, S. M. Hewitt, J. L. Phillips, D. B. Krizman, M. A. Tangrea, M. Ahram, W. M. Linehan, V. Knezevic, M. R. Emmert-Buck.** 2002. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nat. Genet.* **32 Suppl**:509-514.
- Cooke, M. S., M. D. Evans, M. Dizdaroglu, J. Lunec.** 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* **17**:1195-1214.
- Costa, D. L., L. A. Dias-Melicio, M. J. Acorci, A. P. Bordon, E. G. Tavian, M. T. Peracoli, A. M. Soares.** 2007. Effect of interleukin-10 on the *Paracoccidioides brasiliensis* killing by gamma-interferon activated human neutrophils. *Microbiol. Immunol.* **51**:73-80.
- Coutinho, Z. F., D. Silva, M. Lazera, V. Petri, R. M. Oliveira, P. C. Sabroza, B. Wanke** 2002. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad. Saúde Pública,* **18**:1441-1454.
- Cox, G. M., H. C. McDade, S. C. Chen, S. C. Tucker, M. Gottfredsson, L. Wright, T. C. Sorrell, S. D. Leidich, A. Casadevall, M. A. Ghannoum, J. R. Perfect.** 2001. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* **39**:166-175.
- Cox, G. M., T. S. Harrison, H. C. McDade, C. P. Taborda, G. Heinrich, A. Casadevall, J. R. Perfect.** 2003. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infect. Immun.* **71**:173-180.
- Cox, J. M.** 2001. Applications of nylon membrane arrays to gene expression analysis. *J. Immunol. Methods.* **250**:3-13.

- Cunha, D. A., R. M. Zancope-Oliveira, M. S. S. Felipe, S. M. Salem-Izacc, G. S. Deepe Jr., C. M. Soares.** 2002. Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. **9**:374-377.
- Cutler, J. E., G. S. Deepe, B. S. Klein.** 2007. Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold. Nat. Ver. Microbiol. **5**:13-28.
- Czop, J. K.** 1986. The role of beta-glucan receptors on blood and tissue leukocytes in phagocytosis and metabolic activation. Pathol. Immunopathol. Res. **5**:286-296.
- d'Ostiani, C. F., G. Del Sero, A. Bacci, C. Montagnoli, A. Spreca, A. Mencacci P. Ricciardi-Castagnoli, L. Romani.** 2000. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity *in vitro* and *in vivo*. J. Exp. Med. **191**:1661-1674.
- da Silva, S. P., M. I. Borges-Walmsley, I. S. Pereira, C. M. Soares, A. R. Walmsley, M. S. Felipe.** Differential expression of an hsp70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Mol. Microbiol. **31**:1039-1050.
- Dantas, A. S.** 2005. Resposta antioxidante ao estresse oxidativo do fungo dimorfo e patogênico *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, Distrito Federal. Brasil.
- Davidson, J.F., B. Whyte, P. H. Bissinger, R. H. Schiestl.** 1996. Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **93**:5116-5121.
- de Brito, T., M. F. Franco.** 1994. Granulomatous inflammation. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. **36**:185-192.
- de Carvalho, M. J., R. S. Jesuino, B. S. Daher, I. Silva-Pereira, S. M. de Freitas, C. M. Soares, M. S. Felipe.** 2003. Functional and genetic characterization of calmodulin from the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Fungal Genet. Biol. **39**:204-210.
- de Jesús-Berrios, M., L. Liu, J. C. Nussbaum, G. M. Cox, J. S. Stamler, J. Heitman.** 2003. Enzymes that counteract nitrosative stress promote fungal virulence. Curr. Biol. **13**:1963-1968.
- de Mattos Grosso, D., S. R. de Almeida, M. Mariano, and J. D. Lopes.** 2003. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. Infect. Immun. **71**:6534-6542.
- de Waal Malefyt, R., J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor, J. E. de Vries.** 1991. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J. Exp. Med. **174**:1209-1220.

- Deepe, G. S. Jr., R. S. Gibbons.** 2002. Cellular and molecular regulation of vaccination with heat shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* **70**:3759-3767.
- del Poeta.** 2004. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell.* **3**:1067-1075.
- Desjardins, M.** 1995. Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. *Trends Cell Biol.* **5**:183-186.
- Desjardins, M., N. N. Nzala, R. Corsini, C. Rondeau.** 1997. Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. *J. Cell Sci.* **110**:2303-2314.
- Dias-Melicio, L. A., A. P. Moreira, S. A. Calvi, A. M. Soares.** 2006. Chloroquine inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* survival within human monocytes by limiting the availability of intracellular iron. *Microbiol. Immunol.* **50**:307-314.
- Diehn, M., D. A. Relman.** 2001. Comparing functional genomic datasets: lessons from DNA microarray analyses of host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**:95-101.
- Diniz, S. N., P. S. Cisalpino, A. T. Freire, D. N. Silva-Teixeira, C. Contigli, V. Rodrigues Junior, A. M. Goes.** 2001. *In vitro* granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Hum Immunol.* **62**:799-808.
- Diniz, S. N., R. Nomizo, P. S. Cisalpino, M. M. Teixeira, G. D. Brown, A. Mantovani, S. Gordon, L. F. Reis, A. A. Dias.** 2004. PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **75**:649-656.
- Djeu, J. Y., D. K. Blanchard, D. Halkias, H. Friedman.** 1986. Growth inhibition of *Candida albicans* by human polymorphonuclear neutrophils: activation by interferon-gamma and tumor necrosis factor. *J. Immunol.* **137**:2980-2984.
- Ejim, L. J., J. E. Blanchard, K. P. Koteva, R. Sumerfield, N. H. Elowe, J. D. Chechetto, E. D. Brown, M. S. Junop, G. D. Wright.** 2007. Inhibitors of bacterial cystathionine beta-lyase: leads for new antimicrobial agents and probes of enzyme structure and function. *J. Med. Chem.* **50**:755-764.
- Ejim, L. J., V. M. d'Costa, N. H. Elowe, J. C. Loredó-Osti, D. Malo, and G. D. Wright.** 2004. Cystathionine beta-lyase is important for virulence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Infect. Immun.* **72**:3310-3314.
- Falkow, S.** 2004. Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity--a personal recollection 15 years later. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:67-72.

Fan, W., P. R. Kraus, M. J. Boily, J. Heitman. 2005. *Cryptococcus neoformans* gene expression during murine macrophage infection. *Eukaryot. Cell.* **4**:1420-1433.

Farrant, J. L., A. Sansone, J. R. Canvin, M. J. Pallen, P. R. Langford, T. S. Wallis, G. Dougan, J. S. Kroll. 1997. Bacterial copper- and zinc-cofactored superoxide dismutase contributes to the pathogenesis of systemic salmonellosis. *Mol. Microbiol.* **25**:785-796.

Fazioli Rdos, A., L. M. Singer-Vermes, S. S. Kashino, E. Burger, M. F. de Franco, M. Moscardi-Bacchi, V. L. Calich. 1994. Delayed-type hypersensitivity response in an isogenic murine model of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* **126**:137-146.

Feitosa, L. dos S., P. S. Cisalpino, M. R. dos Santos, R.A. Mortara, T.F. Barros, F.V. Morais, R. Puccia, J. F. da Silveira, Z. P. de Camargo. 2003. Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal. Genet. Biol.* **39**:60-69.

Feldmesser, M., Y. Kress, P. Novikoff, A. Casadevall. 2000. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect. Immun.* **68**:4225-4237.

Felipe, M. S., R. V. Andrade, F. B. Arraes, A. M. Nicola, A. Q. Maranhão, F. A. Torres, I. Silva-Pereira, M. J. Poças-Fonseca, E. G. Campos, L. M. Moraes, P. A. Andrade, A. H. Tavares, S. S. Silva, C. M. Kyaw, D. P. Souza, M. Pereira, R. S. Jesuíno, E. V. Andrade, J. A. Parente, G. S. Oliveira, M. S. Barbosa, N. F. Martins, A. L. Fachin, R. S. Cardoso, G. A. Passos, N. F. Almeida, M. E. Walter, C. M. Soares, M. J. Carvalho, M. M. Brigido. PbGenome Network. 2005. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J. Biol. Chem.* **280**:24706-24714.

Felipe, M. S., R. V. Andrade, S. S. Petrofeza, A. Q. Maranhão, F. A. Torres, P. Albuquerque, F. B. Arraes, M. Arruda, M. O. Azevedo, A. J. Baptista, L. A. Bataus, C. L. Borges, E. G. Campos, M. R. Cruz, B. S. Daher, A. Dantas, M. A. Ferreira, G. V. Ghil, R. S. Jesuino, C. M. Kyaw, L. Leitao, C. R. Martins, L. M. Moraes, E. O. Neves, A. M. Nicola, E. S. Alves, J. A. Parente, M. Pereira, M. J. Pocas-Fonseca, R. Resende, B. M. Ribeiro, R. R. Saldanha, S. C. Santos, I. Silva-Pereira, M. A. Silva, E. Silveira, I. C. Simoes, R. B. Soares, D. P. Souza, M. T. De-Souza, E. V. Andrade, M. A. Xavier, H. P. Veiga, E. J. Venancio, M. J. Carvalho, A. G. Oliveira, M. K. Inoue, N. F. Almeida, M. E. Walter, C. M. Soares, M. M. Brigido. 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast.* **20**:263-271.

Fernandez-Botran, R., V. M. Sanders, T. R. Mosmann, E. S. Vitetta. 1988. Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. *J. Exp. Med.* **168**:543-558.

Ferreira, K. S., J. D. Lopes, S. R. Almeida. 2003. Regulation of T helper cell differentiation in vivo by GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* provided by different antigen-presenting cells. *Scand. J. Immunol.* **58**:290-297.

- Ferreira, K. S., J. D. Lopes, S. R. Almeida.** 2004. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunol. Lett.* **94**:107-114.
- Ferreira, K. S., S. R. Almeida.** 2006. Immunization of susceptible mice with gp43-pulsed dendritic cells induce an increase of pulmonary Paracoccidioidomycosis. *Immunol. Lett.* **103**:121-126.
- Figueiredo, F., L. M. Alves, C. L. Silva.** 1993. Tumour necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. *Clin. Exp. Immunol.* **93**:189-194.
- Finlay, B. B., S. Falkow.** 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:136-169.
- Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, T. R. Mosmann, M. Howard, A. O'Garra.** 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* **147**:3815-3822.
- Flavia-Popi, A. F., J. D. Lopes, M. Mariano.** 2002. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol.* **218**:87-94.
- Fradin, C., M. Kretschmar, T. Nichterlein, C. Gaillardin, C. d'Enfert, B. Hube.** 2003. Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. *Mol. Microbiol.* **47**:1523-1543.
- Fradin, C., P. De Groot, D. MacCallum, M. Schaller, F. Klis, F. C. Odds, B. Hube.** 2005. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol. Microbiol.* **56**:397-415.
- Franco, M., M. T. Peracoli, A. Soares, R. Montenegro, R. P. Mendes, D. A. Meira.** 1993. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr. Top. Med. Mycol.* **5**:115- 149.
- Furtado, J. S., T. de Brito, E. Freymuller.** 1967. The structure and reproduction of *Paracoccidioides brasiliensis* in human tissue. *Sabouraudia.* **5**:226-229.
- Gajewski, T. F., F. W. Fitch.** 1988. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J. Immunol.* **140**:4245-4252.
- Gasch, A. P., P. T. Spellman, C. M. Kao, O. Carmel-Harel, M. B. Eisen, G. Storz, D. Botstein, P. O. Brown.** 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell.* **11**:4241-4257.
- Ghannoum, M. A.** 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**:122-143.
- Gil-Lamaignere, C., R. M. Winn, M. Simitopoulou, A. Maloukou, T. J. Walsh, E. Roilides.** 2005. Inteferon gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

augment the antifungal activity of human polymorphonuclear leukocytes against *Scedosporium* spp.: comparison with *Aspergillus* spp. *Med. Mycol.* **43**:253-260.

Glerum, D. M., A. Shtanko, A. Tzagoloff. 1996. Characterization of Cox17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* **271**:14504-14509.

Godon, C., G. Lagniel, J. Lee, J. M. Buhler, S. Kieffer, M. Perrot, H. Boucherie, M. B. Toledano, J. Labarre. 1998. The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**:22480-22489.

Goldani, L. Z., C. M. Monteiro, E. A. Donadi, R. Martinez, J. C. Voltarelli. 1991. HLA antigens in Brazilian patients with paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* **114**: 89- 91.

Goldblatt, D., A. J. Thrasher. 2000. Chronic granulomatous disease. *Clin. Exp Immunol.* **122**:1-9.

Goldman, G. H., E. dos Reis Marques, D. C. Duarte Ribeiro, L. A. de Souza Bernardes, A. C. Quiapin, P. M. Vitorelli, M. Savoldi, C. P. Semighini, R. C. de Oliveira, L. R. Nunes, L. R. Travassos, R. Puccia, W. L. Batista, L. E. Ferreira, J. C. Moreira, A. P. Bogossian, F. Tekaiia, M. P. Nobrega, F. G. Nobrega, M. H. Goldman. 2003. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryot. Cell.* **2**:34-48.

Gonzalez, A. W. de Gregori, D. Velez, A. Restrepo, L. E. Cano. 2000. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect. Immun.* **68**:2546-2552.

Gonzalez, A., B. L. Gómez, A. Restrepo, A. J. Hamilton, L. E. Cano. 2005. Recognition of extracellular matrix proteins by *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Med. Mycol.* **43**:637-645.

Gow, N. A., A. J. Brown, F. C. Odds. 2002. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**:366-371.

Graham, J. E., J. E. Clark-Curtiss. 1999. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:11554-11559.

Greenbaum, D., C. Colangelo, K. Williams, M. Gerstein. 2003. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol.* **4**:117.

Griffin, T. J., S. P. Gygi, T. Ideker. 2002. Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Proteomics.* **1**:323-333.

- Grynberg, M., M. Piotrowska, E. Pizzinini, G. Turner, A. Paszewski.** 2001. The *Aspergillus nidulans* metE gene is regulated by a second system independent from sulphur metabolite repression. *Biochim. Biophys. Acta.* **1519**:78-84.
- Guarro, J., J. Gene, A. M. Stchigel.** 1999. Developments in fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:454-500.
- Gygi, S. P., Y. Rochon, B. R. Franza.** 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell Biol.* **19**:1720–1730.
- Haas, H.** 2003. Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**:316-330.
- Hahn, R. C., J. S. Hamdan.** 2000. Effects of amphotericin B and three azole derivatives on the lipids of yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1997-2000.
- Hallak, J., F. San-Blas, G. San-Blas.** 1982. Isolation and wall analysis of dimorphic mutants of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia.* **20**:51-62.
- Hamdan, J. S., M. A. Resende, A. L. Cunha, C. H. Alves, E. O. Cisalpino.** 1993. Partial biochemical characterization of five *Paracoccidioides brasiliensis* strains *Current Microbiology.* **27**:91-95.
- Hanna, S. A., J. L. Monteiro da Silva, M. J. Giannini.** 2000. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes Infect.* **2**:877-884.
- Harris, S. G., J. Padilha, L. Koumas, D. Ray, R. P. Phipps.** 2002. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* **23**:144–150.
- Hartgers, F. C., C. G. Figdor, G. J. Adema.** 2000. Towards a molecular understanding of dendritic cell immunobiology. *Immunol. Today.* **21**:542-545.
- Herre, J., S. Gordon, G. D. Brown.** 2004. Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages. *Mol. Immunol.* **40**:869–76.
- Heyworth, P. G., J. T. Curnutte, W. M. Nauseef.** 1991. Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558. *J. Clin. Invest.* **87**:352–356.
- Hibbs, J. B. Jr., Z. Vavrin, R. R. Taintor.** 1987. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol.* **138**:550-565.
- Hogan, L. H., B. S. Klein, S. M. Levitz.** 1996. Virulence factors of medically important fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**:469-88.

- Hogan, L. H., B. S. Klein.** 1994. Altered expression of surface alpha-1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. *Infect. Immun.* **62**:3543-3546.
- Honer zu Bentrup, K., D. G. Russell.** 2001. Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment. *Trends Microbiol.* **9**:597-605.
- Hossain, H., S. Tchatalbachev, T. Chakraborty.** 2006. Host gene expression profiling in pathogen-host interactions. *Curr. Opin. Immunol.* **18**:422-429.
- Hoyer, L. L.** 2001. The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **9**:176-180.
- Hube, B., R. Ruchel, M. Monod, D. Sanglard, F. C. Odds.** 1998. Functional aspects of secreted *Candida* proteinases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **436**:339-344.
- Huffnagle, G. B., G. S. Deepe.** 2003. Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:344-350.
- Hung, C. Y., J. J. Yu, K. R. Seshan, U. Reichard, G. T. Cole.** 2002. A parasitic phase-specific adhesin of *Coccidioides immitis* contributes to the virulence of this respiratory fungal pathogen. *Infect. Immun.* **7**:3443-3456.
- Hwang, C. S., G. E. Rhie, J. H. Oh, W. K. Huh, H. S. Yim, S. O. Kang.** 2002. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology.* **148**:3705-3713.
- Hynes, M. J.** 1975. Amide utilization in *Aspergillus nidulans*: evidence for a third amidase enzyme. *J. Gen. Microbiol.* **91**:99-109.
- Ibrahim, A. S., F. Mirbod, S. G. Filler, Y. Banno, G. T. Cole, Y. Kitajima, Edwards JE Jr, Y. Nozawa, M. A. Ghannoum.** 1995. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **63**:1993-1998.
- Ideker, T., V. Thorsson, J. A. Ranish.** 2001. Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science.* **292**:929-934.
- Jackson, S. H., J. I. Gallin, S. M. Holland.** 1995. The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease. *J. Exp. Med.* **182**:751-758.
- Jakob, U., W. Muse, M. Eser, J. C. Bardwell.** 1999. Chaperone activity with a redox switch. *Cell.* **96**:341-352.
- Janeway Jr. C. A., R. Medzhitov.** 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**:197-216.
- Jankovic, D., Z. Liu, W. C. Gause.** 2001. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol.* **22**:450-457.

Jares, P. 2006. DNA microarray applications in functional genomics. *Ultrastruct. Pathol.* **30**:209-219.

Jenner, R. G., R. A. Young. 2005. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:281-94.

Jeong, J. H., E. S. Kwon, J. H. Roe. 2001. Characterization of the manganese containing superoxide dismutase and its gene regulation in stress response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**:908-914.

Jimenez Mdel, P., A. Restrepo, D. Radzioch, L. E. Cano, L. F. Garcia. 2006. Importance of complement 3 and mannose receptors in phagocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by Nrp1 congenic macrophages lines. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **47**:56-66.

Joseph-Horne, T., D. W. Hollomon, P. M. Wood. 2001. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim. Biophys. Acta.* **1504**:179-95.

Kanetsuna, F., L. M. Carbonell. 1970. Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol.* **101**:675-680.

Kashino, S. S., R. A. Fazioli, C. Cafalli-Favati, L. H. Meloni-Bruneri, C. A. Vaz, E. Burger, L. M. Singer, V. L. Calich. 2000. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. *J. Interferon Cytokine Res.* **20**:89-97.

Kashino, S. S., V. L. Calich, L. M. Singer-Vermes, P. A. Abrahamsohn, E. Burger. 1987. Growth curves, morphology and ultrastructure of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Mycopathologia.* **99**:119-128.

Katsikis, P. D., S. B. Cohen, M. Londei, M. Feldmann. 1995. Are CD4+ Th1 cells pro-inflammatory or anti-inflammatory? The ratio of IL-10 to IFN-gamma or IL-2 determines their function. *Int. Immunol.* **7**:1287-1294.

Kawakami, K., M. Tohyama, K. Teruya, N. Kudaken, Q. Xie, A. Saito. 1996. Contribution of interferon-gamma in protecting mice during pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **13**:123-130.

Kerr, J. B., G. V. Schaeffer, D. S. Miranda. 1984. Sex hormones and susceptibility of the rat to paracoccidioidomycosis. *Mycopathology.* **88**:149-154.

Kidd, P. 2003. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev.* **8**:223-246.

Klimpel, K. R., W. E. Goldman. 1988. Cell walls from avirulent variants of *Histoplasma capsulatum* lack alpha-(1,3)-glucan. *Infect. Immun.* **56**:2997-3000.

- Kopp, E., R. Medzhitov.** 2003. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **15**:396-401.
- Kornberg, H. L.** 1966. The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **99**:1-11.
- Kuchroo, V. K., M. Prabhu, J. A. Brown, A. M. Ranger, S. S. Zamvil, R. A. Sobel.** 1995. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules active differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell.* **80**:707-718.
- Kudeken, N., K. Kawakami, A. Saito.** 1998. Different susceptibilities of yeasts and conidia of *Penicillium marneffeii* to nitric oxide (NO)-mediated fungicidal activity of murine macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* **112**:287-293.
- Kunkel, S. L., M. Spengler, M. A. May, R. Spengler, J. Larrick, D. Remick.** 1988. Prostaglandin E2 regulates macrophage derived tumor necrosis factor gene expression. *J. Biol. Chem.* **263**:5380-5384.
- Kurita, N., M. Oarada, E. Ito, M. Miyaji.** 1999b. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* **37**:261-267.
- Kurita, N., M. Oarada, M. Miyaji, E. Ito.** 2000. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* **38**:177-182.
- Kurita, N., S. K. Biswas, M. Oarada, A. Sano, K. Nishimura, M. Miyaji.** 1999a. Fungistatic and fungicidal activities of murine polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* **37**:19-24.
- Kurokawa, C. S., M. F. Sugizaki, M. T. Peracoli.** 1998. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* **40**:125-35.
- Kwon-Chung, K.** 1998. Gene disruption to evaluate the role of fungal candidate virulence genes. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**:381-389.
- Lacerda, G. B., B. Arce-Gomez, F. Q. Telles Filho.** 1988. Increased frequency of HLA-B40 in patients with paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* **26**:253-256.
- Lalani, T., R. K. Simmons, A. R. Ahmed.** 1999. Biology of IL-5 in health and disease. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **82**:317-332.
- Lamarre, C., J. D. LeMay, N. Deslauriers, Y. Bourbonnais.** 2001. *Candida albicans* expresses an unusual cytoplasmic manganese-containing superoxide dismutase (SOD3 gene product) upon the entry and during the stationary phase. *J. Biol. Chem.* **276**:43784-43791.

- Lane, T. E., B. A. Wu-Hsieh, D. H. Howard.** 1994. Antihistoplasma effect of activated mouse splenic macrophages involves production of reactive nitrogen intermediates. *Infect. Immun.* **62**:1940-1945.
- Launois, P., K. G. Swihart, G. Milon, J. A. Louis.** 1997. Early production of IL-4 in susceptible mice infected with *Leishmania* major rapidly induces IL-12 unresponsiveness. *J. Immunol.* **158**:3317-3324.
- Lavigne, L. M., L. R. Schopf, C. L. Chung, R. Maylor, J. P. Sypek.** 1998. The role of recombinant murine IL-12 and IFN-gamma in the pathogenesis of a murine systemic *Candida albicans* infection. *J. Immunol.* **160**:284-292.
- Leal, C. V., B. A. Montes, A. C. Mesa, A. L. Rua, M. Corredor, A. Restrepo, J. G. McEwen.** 2004. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* **42**:391-395.
- Leclerc, M. C., H. Philippe, E. Gueho.** 1994. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J. Med. Vet. Mycol.* **32**:331-341.
- Lee, B. Y, M. A. Horwitz.** 1995. Identification of macrophage and stress-induced proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Invest.* **96**:245-249.
- Lee, S. C., D. W. Dickson, C. F. Brosnan, A. Casadevall.** 1994. Human astrocytes inhibit *Cryptococcus neoformans* growth by a nitric oxide-mediated mechanism. *J. Exp. Med.* **180**:365-369.
- Leidich, S. D., A. S Ibrahim, Y. Fu, A. Koul, C. Jessup, J. Vitullo, W. Fonzi, F. Mirbod, S. Nakashima, Y. Nozawa, M. A. Ghannoum.** 1998. Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **273**:26078-26086.
- Letterio, J. J., A. B. Roberts.** 1998. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu. Rev. Immunol.* **16**:137-61.
- Levitz, S. M.** Interactions of Toll-like receptors with fungi. 2004. *Microbes Infect.* **6**:1351-1355.
- Lilic D.** 2002. New perspectives on the immunology of chronic mucocutaneous candidiasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **15**:143-147.
- Linehan, S. A., L. Martinez-Pomares, S. Gordon.** 2000. Macrophage lectins in host defence. *Microbes Infect.* **2**:279-288.
- Livak, K. J., T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(- $\Delta\Delta C(T)$) Method. *Methods.* **25**:402-408.
- Long, K. H., F. J. Gomez, R. E. Morris, S. L. Newman.** 2003. Identification of heat shock protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. *J. Immunol.* **170**:487-494.

- Longo, V. D., E. B. Gralla, J. S. Valentine.** 1996. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species *in vivo*. J. Biol. Chem. **271**:12275–12280.
- Lorenz, M. C.** 2002. Genomic approaches to fungal pathogenicity. Curr. Opin Microbiology. **5**:372–378.
- Lorenz, M. C., G. R. Fink.** 2002. Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. Eukaryot. Cell. **1**:657-662.
- Lorenz, M. C., J. A. Bender, G. R. Fink.** 2004. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. Eukaryot. Cell. **3**:1076-1087.
- Lu, L., C. A. Bonham, F. G. Chambers, S. C. Watkins, R. A. Hoffman, R. L. Simmons, A. W. Thomson.** 1996. Induction of nitric oxide synthase in mouse dendritic cells by IFN-gamma, endotoxin, and interaction with allogeneic T cells: nitric oxide production is associated with dendritic cell apoptosis. J. Immunol. **157**:3577-3586.
- Lu, S. C.** 2000. S-Adenosylmethionine. Int. J. Biochem. Cell Biol. **32**:391-395.
- Lutz, A.** 1908. Uma micose pseudo-coccídica localizada na boca e observada no Brasil: uma contribuição ao conhecimento das hiphoblastomicoses americanas. Brasil Med. **22**:121-124.
- MacFarlane, A. S., M. G. Schwacha, T. K. Eisenstein.** 1999. *In vivo* blockage of nitric oxide with aminoguanidine inhibits immunosuppression induced by an attenuated strain of *Salmonella typhimurium*, potentiates *Salmonella* infection, and inhibits macrophage and polymorphonuclear leukocyte influx into the spleen. Infect. Immun. **67**:891-898.
- Magee, P. T., C. Gale, J. Berman, D. Davis.** 2003. Molecular genetic and genomic approaches to the study of medically important fungi. Infect. Immun. **71**:2299-2309.
- Maldonado-Lopez, R., M. Moser.** 2001. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. Semin. Immunol. **13**:275-282.
- Mamoni, R. L., M. H. Blotta.** 2006. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. Cytokine. **35**:207-216.
- Mamoni, R. L., S. A. Nouer, S. J. Oliveira, C. C. Musatti, C. L. Rossi, Z. P. Camargo, M. H. Blotta.** 2002. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. Med. Mycol. **40**:153-159.
- Mamoni, R. L., S. A. Nouer, S. J. Oliveira, C. C. Musatti, C. L. Rossi, Z. P. Camargo, M. H. Blotta.** 2002. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. Med. Mycol. **40**:153-159.

- Maris, A. F., A. L. Assumpcao, D. Bonatto, M. Brendel, J. A. Henriques.** 2001. Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. *Curr. Genet.* **39**:37–149.
- Marques Mello, L., M. L. Silva-Vergara, V. Rodrigues Jr.** 2002. Patients with active infection with *Paracoccidioides brasiliensis* present a Th2 immune response characterized by high Interleukin-4 and Interleukin-5 production. *Hum. Immunol.* **63**:149-154.
- Martchenko, M., A. M. Alarco, D. Harcus, M. Whiteway.** 2004. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Mol. Biol. Cell.* **15**:456-67.
- Matute, D. R., J. G. McEwen, R. Puccia, B. A. Montes, G. San-Blas, E. Bagagli, J. T. Rauscher, A. Restrepo, F. Morais, G. Nino-Vega, J. W. Taylor.** 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol. Biol. Evol.* **23**:65-73.
- McEwen, J. G., A. M. Garcia, B. L. Ortiz, S. Botero, A. Restrepo.** 1995. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch. Med. Res.* **26**: 305-306.
- McEwen, J. G., V. Bedoya, M. M. Patino, M. E. Salazar, A. Restrepo.** 1987. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J. Med. Vet. Mycol.* **25**:165–175.
- Medoff, G., M. Sacco, B. Maresca, D. Schlessinger, A. Painter, G. S. Kobayashi, Carratu, L.** 1986. Irreversible block of the mycelial-to-yeast phase transition of *Histoplasma capsulatum*. *Science.* **231**:476-479.
- Medzhitov, R., C. A. Janeway Jr.** 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* **91**:295-308.
- Meira, D. A., P. C. Pereira, J. Marcondes-Machado, R. P. Mendes, B. Barraviera, J. Pellegrino Junior, M. T. Rezkallah-Iwasso, M. T. Peracoli, L. M. Castilho, I. Thomazini, C. L. da Silva, N. T. Foss, P. R. Curi.** 1996. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **55**:496-503.
- Mendes-Giannini, M. J., M. L. Taylor, J. B. Bouchara, E. Burger, V. L. Calich, Escalante, E. D. Hanna, S. A. Lenzi, H. L. Machado, M. P. Miyaji, M. Monteiro, Da Silva, J. L. Mota, E. M. Restrepo, A. Restrepo, S. Tronchin, G. Vincenzi, L. R. Xidieh, C. F. E. Zenteno** 2000. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med Mycol.* **38** Suppl 1:113-23.
- Michel, T., O. Feron.** 1997. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J. Clin. Invest.* **100**:2146-2152.

- Michelin, M. A., F. Figueiredo, F. Q. Cunha.** 2002. Involvement of prostaglandins in the immunosuppression occurring during experimental infection by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exp. Parasitol.* **102**:170–177.
- Missall, T. A., J. K. Lodge, J. E. McEwen.** 2004. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryot. Cell.* **3**:835-846.
- Mok, P. W., D. L. Greer.** 1977. Cell-mediated immune responses in patients with paracoccidioidomycosis. *Clin. Exp. Immunol.* **28**: 89-98.
- Monahan, I. M., J. A. Mangan, P. D. Bucher.** 2002. Extraction of RNA from intracellular *Mycobacterium tuberculosis*: methods, considerations, and application. *In*: T. Parish and N. G. Stoker (ed.), *Mycobacterium tuberculosis* protocols, pp.31-42, Humana Press, Totowa.
- Monahan, I. M., J. Betts, D. K. Banerjee, P. D. Butcher.** 2001. Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages. *Microbiology.* **147**:459-471.
- Montoya, A. E., A. L. Alvarez, M. N. Moreno, A. Restrepo, J. G. McEwen.** 1999. Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* **37**:219-222.
- Montoya, A. E., M. N. Moreno, A. Restrepo, J. G. McEwen.** 1997. Electrophoretic karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet. Biol.* **21**:223-227.
- Moreira, S. F. I., A. M. Bailão, M. S. Barbosa, R. S. A. Jesuíno, M. S. S. Felipe, M. Pereira, C. M. A. Soares.** 2004. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis. *Yeast* **30**:173–182.
- Moscardi-Bacchi, M., E. Brummer, D. A. Stevens.** 1994. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. *J. Med. Microbiol.* **40**:159-164.
- Mosmann, T. R., S. Sad.** 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today.* **17**:138-146.
- Murray, H. W.** 1990. Gamma interferon, cytokine-induced macrophage activation, and antimicrobial host defense. *In vitro*, in animal models, and in humans. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **13**: 411-421.
- Murray, H. W.** 1994. Interferon-gamma and host antimicrobial defense: current and future clinical applications. *Am. J. Med.* **97**:459-467.
- Mylonakis, E., F. M. Ausubel, J. R. Perfect, J. Heitman, S. B. Calderwood.** 2002. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**:15675-15680.

- Nabeshima, S., M. Nomoto, G. Matsuzaki, K. Kishihara, H. Taniguchi, A. S. Yoshida, K. Nomoto.** 1999. T-Cell hyporesponsiveness induced by activated macrophages through nitric oxide production in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **67**:3221-3226.
- Narasipura, S. D., J. G. Ault, M. J. Behr, V. Chaturvedi, S. Chaturvedi.** 2003. Characterization of Cu, Zn superoxide dismutase (SOD1) gene knock-out mutant of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: role in biology and virulence. *Mol. Microbiol.* **47**:1681-1694.
- Nascimento, F. R., V. L. Calich, D. Rodriguez, M. Russo.** 2002. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *J. Immunol.* **168**:4593-600.
- Nathan, C.** 1997. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J. Clin. Invest.* **100**:2417-2423.
- Nathan, C., M. U. Shiloh.** 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**:8841-8848.
- Navarro-Garcia, F., M. Sanchez, C. Nombela J. Pla.** 2001. Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**:245-268.
- Nemecek, J. C., M. Wuthrich, B. S. Klein.** 2006. Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science.* **312**:583-538.
- Newman, S. L., C. Bucher, J. Rhodes, W. E. Bullock.** 1990. Phagocytosis of *Histoplasma capsulatum* yeasts and microconidia by human cultured macrophages and alveolar macrophages. Cellular cytoskeleton requirement for attachment and ingestion. *J. Clin. Invest.* **85**:223-230.
- Nicola, A. M., R. V. Andrade, I. Silva-Pereira.** 2005. Molecular chaperones in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet. Mol. Res.* **4**:346-357.
- Noverr, N. C., S. M. Phare, G. B. Toews, M. J. Coffey, G. B. Huffnagle.** 2001. Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. *Infect. Immun.* **69**:2957-2963.
- O'Garra A.** 1996. Role of cytokines in development of Th1 and Th2 cells. *Chem. Immunol.* **63**:1-13.
- Odds, F. C., N. A. Gow, A. J. Brown.** 2001. Fungal virulence studies come of age. *Genome Biol.* **2**:REVIEWS1009.
- Odom, A., M. Del Poeta, J. Perfect, J. Heitman.** 1997b. The immunosuppressant FK506 and its nonimmunosuppressive analog L-685,818 are toxic to *Cryptococcus neoformans* by inhibition of a common target protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:156-161.

- Odom, A., S. Muir, E. Lim, D. L. Toffaletti, J. Perfect, J. Heitman.** 1997a. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J.* **16**:2576-2589.
- O'Garra, A., K. Murphy.** 1996. Role of cytokines in development of Th1 and Th2 cells. *Chem. Immunol.* **63**:1-13.
- Oswald, I. P., T. A. Wynn, A. Sher, S. L. James.** 1992. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:8676-8680.
- Paris, S., D. Wysong, J. P. Debeauvais, K. Shibuya, B. Philippe, R. D. Diamond, J. P. Latge.** 2003. Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **71**:3551-3562.
- Parkinson, H., M. Kapushesky, M. Shojatalab, N. Abeygunawardena, R. Coulson, A. Farne, E. Holloway, N. Kolesnykov, P. Lilja, M. Lukk, R. Mani, T. Rayner A. Sharma, E. William, Sarkans U, A. Brazma.** 2007. ArrayExpress, a public database of microarray experiments and gene expression profiles. *Nucleic Acids Res.* 35(Database issue):D747-50.
- Pasare, C., R. Medzhitov.** 2004. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect.* **6**:1382-1387.
- Pascon, R. C., T. M. Ganous, J. M. Kingsbury, G. M. Cox, J. H. McCusker.** 2004. *Cryptococcus neoformans* methionine synthase: expression analysis and requirement for virulence. *Microbiology.* **150**:3013-3023.
- Pereira, L. A., M. Pereira, M. S. S. Felipe, R. Zancope-Oliveira, C. M. A. Soares.** 2004. Proteomic identification, nucleotide sequence, heterologous expression and immunological reactivity of the triosephosphate isomerase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* **6**:892-900.
- Perez, R. L., C. A. Rivera-Marrero, J. Roman.** 2003. Pulmonary granulomatous inflammation: From sarcoidosis to tuberculosis. *Semin. Respir. Infect.* **18**:23-32.
- Pessoa, C. R.** 2006. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, Distrito Federal. Brasil.
- Pick, E.** 1986. Microassays for superoxide and hydrogen peroxide production and nitroblue tetrazolium reduction using an enzyme immunoassay microplate reader. *Methods Enzymol.* **132**:407-421.
- Pina, A., R. C. Valente-Ferreira, E. E. Molinari-Madlum, C. A. Vaz, A. C. Keller, V. L. Calich.** 2004. Absence of interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. *Infect. Immun.* **72**:2369-2378.
- Pollock, J. D., D. A. Williams, M. A. Gifford, , L. L. Li, X. Du, J. Fisherman, S. H. Orkin, C. M. Doerschuk, M. C. Dinauer.** 1995. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat Genet.* **9**:202-209.

- Poole, R. K. Hughes, M. N.** 2000. New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. *Mol. Microbiol.* **36**:775–783.
- Powrie, F., R. L. Coffman.** 1993. Inhibition of cell-mediated immunity by IL4 and IL10. *Res. Immunol.* **144**:639-643.
- Punter, F. A., D. M. Glerum.** 2003. Mutagenesis reveals a specific role for Cox17p in copper transport to cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* **278**:30875-30880.
- Quackenbush, J.** 2002. Microarray data normalization and transformation. *Nat. Genet.* **32 Suppl**:496-501.
- Rahman, M. T., V. Parreira, J. F. Prescott.** 2005. *In vitro* and intra-macrophage gene expression by *Rhodococcus equi* strain 103. *Vet Microbiol.* **110**:131-140.
- Rajeevan, M. S., D. G. Ranamukhaarachchi, S. D. Vernon, E. R. Unger.** 2001. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods.* **25**:443-451.
- Rappleye, C. A., J. T. Engle, W. E. Goldman.** 2004. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. *Mol. Microbiol.* **53**:153-65.
- Rappleye, C. A., L. G. Eissenberg, W. E. Goldman.** 2007. *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**:1366-1370.
- Rappleye, C. A., W. E. Goldman.** 2006. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**:281-303.
- Rastogi, N. M., J. P. Bachelet, A. Carvalho de Souza.** 1992. Intracellular growth of *Mycobacterium avium* in human macrophages is linked to the increased synthesis of prostaglandin E2 and inhibition of the phagosome-lysosome fusions. *FEMS Microbiol. Immunol.* **4**:273-279.
- Raupach, B., S. H. Kaufmann.** 2001. Immune responses to intracellular bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* **13**:417-428.
- Reinoso, C., G. Niño-Vega, G. San-Blas, A. Domínguez.** 2005. Random sequencing of *Paracoccidioides brasiliensis* genes. *Med. Mycol.* **43**:681-689.
- Restrepo, A.** 1985. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *J. Med. Vet. Mycol.* **23**: 323-334.
- Restrepo, A., J. G. Mcewen, E. Castaneda.** 2001. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med. Mycol.* **39**:233-241.

- Restrepo, A., M. E. Salazar, L. E. Cano, E. P. Stover, D. Feldman, D. A. Stevens.** 1984. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* **46**: 346-353.
- Restrepo, F. M., M. Restrepo, A. Restrepo.** 1983. Blood groups and HLA antigens in Paracoccidioidomycosis. *Sabouraudia.* **21**:35-39.
- Ricci G., F. T. Mota, A. Wakamatsu, R. C. Serafim, R. C. Borra, M. Franco.** 2004. Canine paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol.* **42**:379-383.
- Riezman, H.** 2004. Why do cells require heat shock proteins to survive heat stress? *Cell Cycle.* **3**:61-63.
- Rikhvanov, E. G., N. N. Varakina, T. M. Rusaleva, E. I. Rachenko, V. K. Voinikov.** 2002. Sodium azide reduces the thermotolerance of respiratively grown yeasts. *Curr. Microbiol.* **45**:394-399.
- Rodrigues, D. R., L. A. Dias-Melicio, S. A. Calvi, M. T. Peracoli, A. M. Soares.** 2007. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med. Mycol.* **45**:27-33.
- Roilides, E., K. Uhlig, D. Venzon, P. A. Pizzo, T. J. Walsh.** 1993. Enhancement of oxidative response and damage caused by human neutrophils to *Aspergillus fumigatus* hyphae by granulocyte colony-stimulating factor and gamma interferon. *Infect. Immun.* **61**:1185-1193.
- Rolston, K.V.** 2004. Management of infections in the neutropenic patient. *Annu. Rev. Med.* **55**:519-526.
- Romani, L.** 2004. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* **4**:1-23.
- Romani, L., F. Bistoni, P. Puccetti.** 2002. Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. *Trends Microbiol.* **10**:508-514.
- Romano, C. C., M. J. Mendes-Giannini, A. J. Duarte, G. Benard.** 2005. The role of interleukin-10 in the differential expression of interleukin-12p70 and its beta2 receptor on patients with active or treated paracoccidioidomycosis and healthy infected subjects. *Clin. Immunol.* **114**:86-94.
- Roncarolo, M. G., M. K. Levings.** 2000. The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* **12**:676-683.
- Rooney, P. J., B. S. Klein.** 2002. Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cell Microbiol.* **4**:127-137.
- Rosen, G. M., S. Pou, C. L. Ramos, M. S. Cohen, B. E. Britigan.** 1995. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J.* **9**:200-209.

- Rubin-Bejerano, I., I. Fraser, P. Grisafi, G. R. Fink.** 2003. Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **100**:11007-11012.
- Rude, T. H., D. L. Toffaletti, G. M. Cox, J. R Perfect.** 2002. Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. Infect. Immun. **70**:5684-5694.
- Russo, M., H. C. Teixeira, M. C. Marcondes, J. A. Barbuto.** 1989. Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. Braz. J. Med. Biol. Res. **22**:1271-1273.
- Sadahiro, A., A. C. Roque, M. A. Shikanai-Yasuda.** 2007. Generic human leukocyte antigen class II (DRB1 and DQB1) alleles in patients with paracoccidioidomycosis. Med. Mycol. **45**:35-40.
- Salazar, M. E., A. Restrepo, D. A. Stevens.** 1988. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Infect. Immun. **56**: 711-713.
- Salem-Izacc, S. M., F. J. Gomez, R. S. A. Jesuino, C. A. Fonseca, M. S. S. Felipe, G. S. Deepe Jr, C. M. A. Soares.** 2001. Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Med. Mycol. **39**:445-455.
- Salkowski, C. A, E. Balish.** 1991. Susceptibility of congenitally immunodeficient mice to a nonencapsulated strain of *Cryptococcus neoformans*. Can. J. Microbiol. **37**:834-839.
- San-Blas, G., F. V. San-Blas.** 1977. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. Mycopathologia. **62**:77-86.
- San-Blas, G., F. V. San-Blas.** 1987. Un modelo de dimorfismo en hongos patógenos: *Paracoccidioides brasiliensis*. Cur. Microbiol. **8**:85-88.
- Sandor, M., J. V. Weinstock, T. A. Wynn.** 2003. Granulomas in schistosome and mycobacterial infections: a model of local immune responses. Trends Immunol. **24**:44-52.
- Sano, A., M. Miyatji, K. Nishimura.** 1992. Studies on the relationship between the estrous cycle of Balb/c mice and their resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Mycopathology. **119**: 141-145.
- Santangelo, R. T., M. H. Nouri-Sorkhabi, T. C. Sorrell, M. Cagney, S. C. Chen, P. W. Kuchel, L. C. Wright.** 1999. Biochemical and functional characterisation of secreted phospholipase activities from *Cryptococcus neoformans* in their naturally occurring state. J Med Microbiol. **48**:731-740.
- Schaffner, A., C. E. Davis, T. Schaffner, M. Markert, H. Douglas, A. I. Braude.** 1986. *In vitro* susceptibility of fungi to killing by neutrophil granulocytes discriminates between primary pathogenicity and opportunism. J. Clin. Invest. **78**:511-524.

- Schaible, U. E., S. H. Kaufmann.** 2004. Iron and microbial infection. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:946-953.
- Schnappinger, D., S. Ehrt, M. I. Voskuil, Y. Liu, J. A. Mangan, I. M. Monahan, G. Dolganov, B. Efron, P. D. Butcher, C. Nathan, G. K. Schoolnik.** 2003. Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages: insights into the phagosomal environment. *J. Exp. Med.* **198**:693-704.
- Schwacha, M. G., J. J. Meissler, T. K. Eisenstein.** 1998. *Salmonella typhimurium* infection in mice induces nitric oxide-mediated immunosuppression through a natural killer cell-dependent pathway. *Infect. Immun.* **66**:5862-5866.
- Seder, R. A.; Paul, W. E.** 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu. Rev. Immunol.* **12**:635-373.
- Shikanai-Yasuda, M. A., F. Q. Telles Filho, R. P. Mendes A. L. Colombo, M. L. Moretti.** 2006. Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **39**:297-310.
- Shikanai-Yasuda, M. A., G. Benard, Y. Higaki, G. M. Del Negro, S. Hoo, E. H. Vaccari, R. C. Gryschek, A. A. Segurado, A. A. Barone, D. R. Andrade.** 2002. Randomized trial with itraconazole, ketoconazole and sulfadiazine in paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol.* **40**:411-417.
- Sicher, S. C., M. A. Vazquez, C. Y. Lu.** 1994. Inhibition of macrophage Ia expression by nitric oxide. *J. Immunol.* **153**:1293-1300.
- Sigler, K., J. Chaloupka, J. Brozmanova, N. Stadler, M. Hofer.** 1999. Oxidative stress in microorganisms--I. Microbial vs. higher cells--damage and defenses in relation to cell aging and death. *Folia Microbiol (Praha).* **44**:587-624.
- Silva, C. L., L. M. Alves, F. Figueiredo.** 1994. Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology.* **140**:1189-1194.
- Silva, S. P., M. I. Borges-Walmsley, I. S. Pereira, C. M. A. Soares, A. R. Walmsley, M. S. S. Felipe.** 1999. Differential expression of an hsp 70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mol. Microbiol.* **31**:1039-1050.
- Singer-Vermes L. M., E. Burger, M. F. Franco, M. M. Di-Bacchi, M. J. Mendes-Giannini, V. L. Calich.** 1989. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *J. Med. Vet. Mycol.* **27**:71-82.
- Singer-Vermes, L. M., C. B. Caldeira, E. Burger, L. G. Calich.** 1993. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. *Clin. Exp. Immunol.* **94**:75-79.

- Soares, R. de B., T. A. Velho, L. M. de Moraes, M. O. Azevedo, C. M. Soares, M. S. Felipe.** 2005. Hygromycin B-resistance phenotype acquired in *Paracoccidioides brasiliensis* via plasmid DNA integration. *Med. Mycol.* **43**:719-723.
- Souto, J. T., F. Figueiredo, A. Furlanetto, K. Pfeffer, M. A. Rossi, J. S. Silva.** 2000. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am. J. Pathol.* **156**:1811-1820.
- Souto, J. T., J. C. Aliberti, A. P. Campanelli, M. C. Livonesi, C. M. Maffei, B. R. Ferreira, L. R. Travassos, R. Martinez, M. A. Rossi, J. S. Silva.** 2003. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis* -infected mice is modulated by interferon-gamma. *Am. J. Pathol.* **163**:583-590.
- Splendore, A.** 1912. Zymonematosi con localizzazione nella cavita della bocca, osservata in Brasile. *Bull. Soc. Path. Exot.* **5**: 313-319.
- Staab, J. B., S. D. Bradway, P. L. Fidel, P. Sundstrom.** 1999. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* **283**:1535–1538.
- Steele, C., L. Marrero, S. Swain, A. G. Harmsen, M. Zheng.** 2003. Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* sp. muris involves molecular recognition by the Dectin-1 betaglukan receptor. *J. Exp. Med.* **198**:1677–1688.
- Steele, P. E.** 1991. Current concepts of fungal virulence. *Adv. Pthol. Lab. Med.* **4**:107-119.
- Steen, B. R., T. Lian, S. Zuyderduyn, W. K. MacDonald, M. Marra, S. J. Jones, J. W. Kronstad.** 2002. Temperature-regulated transcription in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genome Res.* **12**:1386-1400.
- Steenbergen, J. N., H. A. Shuman, A. Casadevall.** 2001. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:15245-15250.
- Steenbergen, J. N., J. D. Nosanchuk, S. D. Malliaris, A. Casadevall.** 2004. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infect. Immun.* **72**:3478-3488.
- Stevanin, T. M., R. K. Poole, E. A. Demoncheaux, R. C. Read.** 2002. Flavohemoglobin Hmp protects *Salmonella enterica* serovar typhimurium from nitric oxide-related killing by human macrophages. *Infect. Immun.* **70**:4399-4405.
- Stevenhagen, A., R. van Furth.** 1993. Interferon-gamma activates the oxidative killing of *Candida albicans* by human granulocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **91**:170-175.
- Stoughton, R. B.** 2005. Applications of DNA microarrays in biology. *Annu. Rev. Biochem.* **74**:53-82.
- Sundstrom, P.** 1999. Adhesins in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:353–357.

- Swanson, M. S., B. K. Hammer.** 2000. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:567-613.
- Szabo, S. J., A. S. Dighe, U. Gubler, K. M. Murphy.** 1997. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J. Exp. Med.* **185**:817-824.
- Tai, X. G., K. Toyo-oka, N. Yamamoto, Y. Yashiro, J. Mu, T. Hamaoka, H. Fujiwara.** 1997. Expression of an inducible type of nitric oxide (NO) synthase in the thymus and involvement of NO in deletion of TCR-stimulated double-positive thymocytes. *J. Immunol.* **158**:4696-4703.
- Tavares, A. H., S. S. Silva, V. V. Bernardes, A. Q. Maranhão, C. M. Kyaw, M. Pocas-Fonseca, I. Silva-Pereira.** 2005. Virulence insights from the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet. Mol. Res.* **4**:372-389.
- Taylor, P. R., S. V. Tsoni, J. A. Willment, K. M. Dennehy, M. Rosas, H. Findon, K. Haynes, C. Steele, M. Botto, S. Gordon, G. D. Brown.** 2007. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat. Immunol.* **8**:31-38.
- Theodoro, R.C., J. M. Candeias, J. P. Araújo, S. M. Bosco, S. A. Macoris, L. O. Padula, M. Franco, E. Bagagli.** 2005. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol.* **43**:725-729.
- Thomas, P. W., E. E. Wyckoff, E. J. Pishko, J. J. Yu, T. N. Kirkland, G. T. Cole.** 1997. The hsp60 gene of the human pathogenic fungus *Coccidioides immitis* encodes a T-cell reactive protein. *Gene.* **199**:83-91.
- Timm, J., F. A. Post, L. G. Bekker, G. B. Walther, H. C. Wainwright, R. Manganeli, W. T. Chan, L. Tsenova, B. Gold, I. Smith, G. Kaplan, J. D. McKinney.** 2003. Differential expression of iron-, carbon-, and oxygen-responsive mycobacterial genes in the lungs of chronically infected mice and tuberculosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**:14321-14326.
- Travassos, L. R., R. Puccia, P. Cisalpino, C. Taborda, E.G. Rodrigues, M. Rodrigues, J. F. Silveira, I. C. Almeida.** 1995. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch. Med. Res.* **26**:297-304.
- Tusher, V. G., R. Tibshirani, G. Chu.** 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:5116-5121.
- Twigg, H. L.** 2004. Macrophages in innate and acquired immunity. *Semin. Respir. Crit. CareMed.* **25**:21-31.
- Tzianabos, A. O.** 2000. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**:523-533.
- van Burik J. A., P. T. Magee.** 2001. Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**:743-72.

- Vazquez-Torres, A., E. Balish.** 1997. Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:170-192.
- Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, E. Balish.** 1996. Peroxynitrite contributes to the candidacidal activity of nitric oxide-producing macrophages. *Infect. Immun.* **64**:3127-3133.
- Venancio, E.J., C. M. Kyaw, C. V. Mello, S. P. Silva, C. M. A. Soares, M. S. S. Felipe.** 2002. Identification of differentially expressed transcripts in the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by differential display. *Med. Mycol.* **40**:45-51.
- Venkataprasad, N., H. Shiratsuchi, J. L. Jonson.** 1996. Induction of prostaglandin E2 by human monocytes infected with *Mycobacterium avium* complex – modulation of cytokine expression. *J. Infect. Dis.* **174**:806-811.
- Vicentini, A. P., J. L. Gesztesi, M. F. Franco, W. de Souza, J. Z. de Moraes, L. R. Travassos, J. D. Lopes.** 1994. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect. Immun.* **62**:1465-1469.
- Vigna, A. F., S. R. Almeida, P. Xander, E. Freymuller, M. Mariano, J. D. Lopes.** 2006. Granuloma formation *in vitro* requires B-1 cells and is modulated by *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 antigen. *Microbes Infect.* **8**:589-597.
- Walter, S., J. Buchner.** 2002. Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **41**:1098-1113.
- Wilks, K. E., K. L. Dunn, J. L. Farrant, K. M. Reddin, A. R. Gorringer, P. R. Langford, J. S. Kroll.** 1998. Periplasmic superoxide dismutase in meningococcal pathogenicity. *Infect. Immun.* **66**:213-217.
- Williams, D. L., A. Mueller, W. Browder.** 1996. Glucan-based macrophage stimulators: A review of their anti-infective potential. *Clinical Immunotherapy* **5**:392-399.
- Williams, G. T., W. J. Williams.** 1983. Granulomatous inflammation--a review *J. Clin. Pathol.* **36**:723-733.
- Woods, J. P.** 2003. Knocking on the right door and making a comfortable home: *Histoplasma capsulatum* intracellular pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:327-331.
- Wu-Hsieh, B. A., W. Chen, H. J. Lee.** 1998. Nitric oxide synthase expression in macrophages of *Histoplasma capsulatum*-infected mice is associated with splenocyte apoptosis and unresponsiveness. *Infect. Immun.* **66**:5520-5526.
- Xie, Q., W. Cho, H. J. Calaycay, J. Mumford, R. A. Swiderek, K. M. Lee, T. D. Ding, A. T. Troso, C. Nathan.** 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science.* **256**:225-228.

Yamaguchi, M., H. Yamaki, T. Shinoda, Y. Tago, H. Suzuki, T. Nishimura, H. Yamaguchi. 1990. The mode of antifungal action of (S)2-amino-4-oxo-5-hydroxypentanoic acid, RI-331. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **43**:411-416.

Yang, Z., R. C. Pascon, A. Alspaugh, , G. M. Cox, J. H. McCusker. 2002. Molecular and genetic analysis of the *Cryptococcus neoformans* MET3 gene and a met3 mutant. *Microbiology*. **148**:2617–2625.

Zacharias, D., A. Ueda, M. Moscardi-Bacchi, M. Franco, G. A. San-Blas. 1986. A comparative histopathological, immunological, and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycosis induced in mice by three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *J. Med. Vet. Mycol.* **24**:445-454.

Zhai, Y., R. M. Ghobrial, R. W. Busuttil, J. W. Kupiec-Weglinski. 1999. Th1 and Th2 cytokines in organ transplantation: paradigm lost? *Crit. Rev. Immunol.* **19**: 155-172.

Zlotnik, A., O. Yoshie. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. **12**:121-127.