

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

*RAQUEL CORDEIRO THEODORO*

**Caracterização da transição micélio – levedura em  
*Paracoccidioides brasiliensis* e sua relação com a  
expressão do gene do choque térmico 70 (HSP70)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração: Genética.

*Orientador: Dr. Eduardo Bagagli*  
*Co-orientador: Ivan de Godoy Maia*

Botucatu, 2007

## Índice

	<b>Pág.</b>
Agradecimentos	3
I Revisão de Literatura.....	7
II Proposta do projeto de mestrado.....	28
III Resumo.....	31
IV Artigo.....	32
V Anexos.....	68
VI Discussão Geral.....	80
VII Referências Bibliográficas.....	88

*Dedico este trabalho*

***Aos meus pais, Salete e Pedro, e aos meus avós Emília,  
Francisco e Antônio (in memoriam), meu espelho de  
vida, minha referência, minha família.***

## *Agradeço*

### ***Ao meu orientador e amigo Eduardo,***

*Sua orientação se baseia em muito mais do que transmitir conhecimentos, mas também, e principalmente, em nos mostrar o quanto é bom aprender e o quanto ainda nos falta saber. Sem dúvida é um mestre muito querido, um exemplo a ser seguido e admirado.*

*Obrigada Eduardo, por todos esses anos de orientação e convivência.*

### ***Ao co-orientador Ivan de Godoy Maia,***

*Pelas críticas e sugestões sempre pertinentes, pela atenção e paciência para tirar as minhas dúvidas.*

***Ao meu namorado Mateus, por todo amor e carinho, amigo que consegue sempre arrancar um sorriso meu, não importa o momento.***

***Aos Tios (Cleide, Nilza, Dorival e Fausto) e aos primos (Anderson, Andréia, Adriana, Cátia e Elaine) pelo carinho e pela torcida.***

***Aos amigos de bancada, Sandra, Assis, Lígia, Virgínia, Gisela, Gabriela, Keila, Juliana, Silvinha e Hélio, sempre unidos e participativos: minha família Botucatuense.***

***Aos amigos Martha, Lara, Clívia, Fernanda, Emanuel (Manezinho), Gisleine, Ana Luísa e a todos os Feitosas, pessoas únicas e especiais em minha vida.***

***À Meg, é claro..., companheira de todas as horas, sempre disposta a longos passeios, trilhas para cachoeiras e brincadeiras, sempre renovando minhas energias. Sem dúvida, uma amiga fiel e carinhosa com a qual sempre posso contar.***

***Ao professor e amigo Guaracy, pela orientação a mim prestada durante o estágio docência na disciplina de Evolução, por todos os***

*ensinamentos e oportunidades. Sem dúvida contribuiu e muito para a minha formação.*

***Aos professores João Candeias e João Pessoa por abrirem as portas de seus laboratórios e por me orientarem durante as reações de PCR em Tempo real.***

***À Dra. Sandra, por toda atenção e ensinamentos sobre PCR em Tempo Real.***

***Aos professores Gustavo H. Goldman e Everaldo Marques (USP, Ribeirão Preto) pelas seqüências de alfa e beta tubulinas cedidas para o desenho de primers.***

***À professora Cláudia, pela ajuda prestada nas análises morfométricas.***

***À professora Luzia, por me socorrer nos testes estatísticos.***

***Aos funcionários do Depto de Micro e Imunologia, Sônia, Lula, Ademival, Tino, Pedro e Nice, por todo carinho e dedicação aos alunos.***

## I Revisão de Literatura

### I.1 *Paracoccidioides brasiliensis*: taxonomia, etiologia e ecologia.

*P. brasiliensis* é a fase anamórfica (mitospórica) de um ascomiceto pertencente à Ordem Onygenales, Família Onygenaceae, recentemente re-classificado na nova Família Ajellomycetaceae, a qual representa a um clado monofilético que inclui também os gêneros *Blastomyces*, *Emmonsia* e *Histoplasma* (UNTEREINER et al., 2004).

O *P. brasiliensis* é o agente etiológico da Paracoccidioidomicose, doença caracterizada pelo desenvolvimento de lesões granulomatosas com freqüente evolução crônica, envolvendo pulmão, pele, membranas mucosas e outros tecidos (FRANCO, 1987). Este fungo apresenta distribuição geográfica restrita aos países latino-americanos, ocorrendo com maior incidência no Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina (WANKE & LONDERO, 1994).

Este patógeno possui um dimorfismo morfológico termo-dependente, a 35-37°C (*in vitro*, em meios enriquecidos ou no tecido do hospedeiro em condição de parasitismo) possui forma de levedura com multibrotamentos, aspecto conhecido como “roda de leme” (LACAZ et al., 1984) e à 25°C (*in vitro* ou em ambiente sob condições de saprofitismo) cresce na forma de micélios aéreos curtos bastante aderidos ao meio de cultura, as hifas são septadas, com artrósporos, clamidoconídios intercalares e aleuriósporos globosos (MARQUES & CAMARGO et al., 1998).

O *P. brasiliensis* tem sua ecologia praticamente desconhecida devido aos dados pouco conclusivos a respeito de seu isolamento ambiental. O caráter casual e não repetitivo das observações, aliado às dificuldades de isolamento ambiental, dificultam a exata localização deste patógeno no ambiente. Além disso, a falta de surtos epidêmicos, o prolongado período de latência da doença e freqüentes migrações das populações de áreas

endêmicas, tornam praticamente impossível a identificação dos locais onde a infecção foi adquirida (RESTREPO, 1985).

Apesar destas dificuldades, existe um “certo consenso”, baseado em outras micoses sistêmicas provocadas por fungos dimórficos, onde, o pulmão é o órgão mais afetado, de que o *P. brasiliensis* vive saprofiticamente no solo e/ou vegetais, produzindo estruturas assexuadas na forma de artroconídias (BUSTAMANTE-SIMON et al., 1985), as quais seriam as responsáveis pela infecção principalmente pelo trato respiratório (MCEWEN et al., 1987).

Existem alguns casos de isolamento do *P. brasiliensis* em solo (SHOME & BATISTA, 1963; NEGRONI, 1968; ALBORNOZ, 1971 e SILVA-VERGARA et al., 1998), sendo que os dois primeiros isolamentos não foram totalmente confirmatórios para *P. brasiliensis*, já que o isolado nem mesmo foi mantido em coleção (FRANCO et al., 2000). Além destes isolamentos, o patógeno também já foi detectado em ração canina (FERREIRA et al., 1990), trato intestinal de morcegos (GROSE & TRAMSITT, 1995) e fezes de pingüim (GESUELE, 1989).

Um novo indício ambiental da presença do *P. brasiliensis* em solo foi a constatação da ocorrência do mesmo, em alta frequência, em tatus da espécie *Dasyus novemcinctus* (NAIFF et al., 1986, MACEDO et al., 1999; SILVA-VERGARA et al., 2000; CORREDOR et al., 1999; BAGAGLI et al., 1998; 2003), animais com intenso hábito fossorial e escavatório, cuja distribuição geográfica costuma coincidir com a observada na paracoccidioidomicose (RESTREPO, 1994). O contato com estes animais está associado a um aumento dos fatores de riscos para a infecção em pessoas residentes nas áreas endêmicas da doença (CADAVID & RESTREPO, 1993).

Além da metodologia direta (cultura) e indireta (inoculação animal), métodos moleculares vem sendo empregados para a detecção do *P. brasiliensis* em solo através da



PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) de regiões do rDNA, que compreendem o ITS1 (Internal transcribed spacer 1), 5.8S e ITS2 (Internal transcribed spacer 2), específicas do *P. brasiliensis* (THEODORO et al., 2005a). A técnica molecular empregada se mostrou eficaz na detecção do DNA do patógeno em tocas de tatu, infectados naturalmente pelo fungo.

Por apresentar temperatura corporal e imunidade relativamente baixa (PURTILO et al., 1975; ULRICH et al., 1976), o tatu parece favorecer o desenvolvimento de certas doenças infecciosas, podendo ter desempenhado um importante papel na evolução do *P. brasiliensis* à condição zoofílica (adaptada ao tecido animal) (BAGAGLI et al., 1998), o que explica o estabelecimento de lesões crônicas nos hospedeiros e a baixa produção de conídios (MCEWEN et al., 1987), o que talvez justifique o difícil isolamento ambiental deste fungo em sua fase saprofítica (FRANCO et al., 2000).

Os isolados de tatus apresentam significativa diversidade em relação à virulência (SANO et al., 1999; HEBELER-BARBOSA et al., 2003a, 2003b). Hebler-Barbosa et al (2003a; 2003b) caracterizaram a biodiversidade de isolados de *P. brasiliensis* de tatus, comparando-os com isolados clínicos da região endêmica de Botucatu, com relação aos diferentes perfis de virulência, através de inoculação animal (hamsters), padrão de RAPD e sequenciamento da região de ITS rDNA 5.8S. Através da inoculação animal e contagem de UFC (unidades formadoras de colônias), foi possível caracterizar os isolados quanto à virulência (muito alta, alta, intermediária e baixa). Apesar de não fornecer uma correlação clara com os perfis de virulência, o padrão de RAPD mostrou que os isolados de tatu provenientes de uma mesma área geográfica são mais similares entre si do que isolados provenientes de áreas distantes uma das outras. Este dado parece ser bastante preciso, visto que estes animais possuem uma “home range” pequena (LOUGHRY & MCDONOUGH, 1998), locomovendo-se em trilhas relativamente constantes no interior de pequenas matas de galerias (TABER, 1945, TAMAGE & BUCHANAN, 1954), não tendo hábito migratório

como no caso dos seres humanos. Com relação ao seqüenciamento da região ITS1, 5.8S e ITS2, enquanto o gene 5.8S apresentou-se altamente conservado, tanto entre os diferentes isolados como entre *P. brasiliensis* e *Blastomyces dermatitidis*, a região ITS apresentou-se significativamente variável entre as duas espécies. Apesar de relativamente conservada entre os diferentes isolados de *P. brasiliensis*, tal região mostrou algumas variações, como por exemplo, o isolado T10B1, que apresentou maior variabilidade em relação aos demais, tendo uma substituição no ITS1 e duas no ITS2.

Análises comparativas das seqüências da região ITS e também do gene codificador da glicoproteína antigênica GP43, confirmam a similaridade entre os isolados clínicos e de tatus (HEBELER-BARBOSA et al., 2003b), indicando que tanto o homem quanto os tatus estão se infectando pelos mesmos “ecopatogenotipos” (BAGAGLI et al., 1998; FRANCO et al., 2000; RESTREPO et al., 2000). A caracterização molecular dos isolados de tatu e sua comparação com os isolados clínicos pode ser de grande utilidade no mapeamento de genótipos do *P. brasiliensis* que estão causando infecções humanas.

Além da espécie *D. novemcinctus*, o fungo também foi isolado do tatu *Cabassous centralis*, em Caldas, Colômbia, indicando que outras espécies além do tatu-galinha também podem estar infectadas com o patógeno (Corredor et al., 2005).

Recentemente foram relatados dois casos de PCM em cães (RICCI et al., 2004, FARIAS et al., 2005), sendo obtida cultura fúngica apenas para o segundo caso. O isolado foi caracterizado molecular e morfológicamente (BOSCO et al., 2005). Este achado é de grande importância para o estudo epidemiológico da PCM, pois representa o primeiro isolamento de *P. brasiliensis* de um animal doméstico, cujo contato com humanos é infinitamente superior se comparado com animais silvestres. Além disso, isolados provenientes de cães são importantes candidatos para estudos filogenéticos, já que estes

mamíferos, comparados aos tatus, representam uma condição ambiental distinta, a começar pela temperatura corporal superior, que pode variar de 37,5 a 39°C.

## **I.2 *P. brasiliensis*: uma só espécie?**

Trabalhos recentes demonstraram que a variabilidade genética do *P. brasiliensis* pode ir além de um simples polimorfismo intraespecífico, caracterizando a presença de espécies crípticas, ou seja, espécies em divergência cujos caracteres fenotípicos até então conhecidos não são suficientes para distingui-las (FUTUYAMA, 2002). Matute et al (2006) analisaram seqüências de DNA de oito regiões a partir de cinco genes nucleares codificadores (quitina sintase,  $\beta$ -glucana sintase, fator adenil de ribosilação,  $\alpha$ -tubulina e PbGP43). Foram estudados 65 isolados de *P. brasiliensis*, abrangendo seis áreas endêmicas de PCM. Através da análise por concordância de genealogia de genes foi possível detectar três espécies crípticas: S1, encontrada no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela; PS2, encontrada no Brasil e Venezuela e PS3, encontrada apenas na Colômbia. S1 e PS2 são simpátricas, portanto a divergência genética entre as duas sugere a existência de uma barreira não geográfica ao fluxo gênico.

Espécies crípticas também já foram detectadas, por concordância de genealogias de genes, em outros fungos patogênicos dimórficos como, por exemplo, *Coccidioides immitis* (separado em duas espécies sexuadas, *C. immitis* e *C. posadasii* segundo a concordância de 3 genealogias de genes) (KOUFOPANOU et al., 2001) e *Histoplasma capsulatum* (separado em 7 espécies filogenéticas mais 1 espécie da Eurásia que emergiu do clado da América do Sul, grupo A, segundo a concordância de quatro genealogias de genes) (KASUGA et al., 1999, 2003).

O reconhecimento filogenético de espécie, aplicado nos trabalhos acima citados, parece ser a forma ideal para diagnosticar espécies crípticas. Sabe-se que o reconhecimento morfológico de espécie, ainda o mais usado para diagnosticar espécie em fungos, pode englobar em um só grupo espécies que na verdade diferem geneticamente podendo estar até mesmo isoladas reprodutivamente. Já o reconhecimento biológico de espécie, cujo critério é a capacidade de intercruzamento, além de apenas ser aplicável às espécies sexuadas, incorre em um conflito entre fluxo gênico real e fluxo gênico potencial. O reconhecimento filogenético de espécie, por sua vez detecta divergência genética e passa a ser o método mais efetivo de definição de espécie em microrganismos, uma vez que muitos caracteres podem diferir entre duas espécies antes mesmo da perda do potencial de intercruzamento. Entretanto, adquirir seqüências de vários loci com variação genética suficiente para detectar espécies filogenéticas pode ser extremamente trabalhoso, tornando o uso de marcadores hipervariáveis (moleculares e/ou morfológicos) atrativo para um rápido reconhecimento das diferentes espécies crípticas (TAYLOR et al., 2000).

Sabe-se que nas espécies crípticas de *H. capsulatum* pode-se detectar diferenças morfológicas e fisiológicas entre isolados pertencentes às diferentes espécies (KASUGA et al., 2003). No caso do *Coccidioides*, observou-se que a espécie *C. posadasii* cresce mais lentamente em meio contendo alta concentração de sais quando comparada com a espécie *C. immitis*, porém este fenótipo não é usado como diagnóstico (FISHER et al., 2002).

Em *P. brasiliensis*, existem muitos fenótipos variáveis, como crescimento, aspecto de colônia miceliana, produção de conídios, transição micélio/levedura, microscopia leveduriforme (brotamentos, forma e tamanho das células, etc), virulência, termotolerância, entre outros (THEODORO et al., 2005b). Porém nenhum estudo comparativo e de agrupamento foi feito, utilizando-se de dados morfológicos, clínicos e ecológicos,

associados aos moleculares, de forma a melhor organizar e compreender a existência e o significado de toda a variabilidade fenotípica e genotípica observada.

### **I.3 *P. brasiliensis*: virulência e dimorfismo**

Além da caracterização molecular, outros estudos, com enfoque em caracteres morfológicos vêm sendo realizados (MACORIS et al., 2006) a fim de correlacioná-los com caracteres de virulência. Neste estudo, realizado em nosso laboratório, foram observadas variações fenotípicas entre as colônias miceliais do *P. brasiliensis* com relação a caracteres como curva de crescimento, presença de setores (possível indicativo de rearranjos cromossomais e recombinação mitótica) diâmetro e textura da colônia (frente e verso). Foi observada grande variabilidade fenotípica entre os isolados e também em um mesmo isolado (o isolado Bt84 possui colônias de textura algodonosa e glabra). Tal fenômeno em *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* é tido como um fator de virulência (SOLL, 1992; LACHKE et al., 2002; FRIES et al., 2002).

Tais variações fenotípicas, tanto inter como intra isolados mostram grande plasticidade deste patógeno, tal plasticidade pode estar associada á adaptação á diferentes ambientes pelo fungo. No caso do *P. brasiliensis* como dos demais fungos dimórficos patogênicos a mudança do saprofitismo para o parasitismo incorre em inúmeras mudanças ambientais, já que o hospedeiro promove condições de crescimento diferente das do ambiente saprofítico, a começar pelo aumento de temperatura, influências hormonais e resposta do sistema imune (KUROKAWA et al., 1998). Dessa forma, as variações fenotípicas poderiam ser essenciais para a adaptação ao parasitismo, promovendo a emergência de variantes capazes de escapar dos mecanismos de defesa do sistema imunológico do hospedeiro (FRANZOT et al., 1998).

Alguns caracteres fenotípicos são considerados fatores de virulência em fungos causadores de micoses sistêmicas, graças a esses fatores, alguns fungos, tais como os fungos dimórficos apresentam grande habilidade para crescer em condições adversas impostas pelos seus hospedeiros, sendo estas características resultantes da interação patógeno-hospedeiro (BULMER & FROMTLING, 1983; HOGAN et al., 1996). Sendo assim os padrões de virulência de diferentes patógenos poderiam ser considerados frutos de uma seleção natural resultante da interação entre os dois genótipos, o do patógeno e do hospedeiro (LEDERBERG, 1999).

Porém, muitos caracteres considerados fatores de virulência e patogenicidade em fungos dimórficos, como *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* e *Cryptococcus neoformans*, podem ter se originado no meio saprofítico (em geral solo), através da interação destes patógenos com microrganismos fagocíticos predadores. Hoje, tais caracteres apresentam papéis distintos durante o saprofitismo e durante o parasitismo. A idéia de que os fatores de virulência tenham surgido em meio saprofítico também é sustentada pelo fato de que estes fungos patogênicos dimórficos não necessitam de seu hospedeiro endotermo para sua sobrevivência, o encontro com este hospedeiro teria sido acidental e os fatores de virulência já estariam “prontos” (“ready-made virulence”) (CASADEVALL et al., 2003 e STEENBERGEN et al 2003; 2004). Apesar do animal não ser indispensável para o ciclo de vida do fungo, ele exerce importante papel na história evolutiva do mesmo devido sua importância como agente carreador e amplificador de variabilidade genética do patógeno (BAGAGLI et al., 2006).

Os conceitos de patogenicidade e virulência foram muito bem trabalhados por Casadevall & Pirofski (1999). Nesta revisão, patogenicidade é tida como a capacidade do patógeno em causar danos ao seu hospedeiro e virulência como a capacidade relativa de causar danos; relativa pois a doença depende não só dos fatores de virulência do patógeno

como também da resposta do sistema imunológico de seu hospedeiro. Os autores criaram seis classes de patógenos com base na virulência do microrganismo e na resposta imunológica. Ao que tudo indica, o *P. brasiliensis* pertenceria à classe 3, na qual os microrganismos causam doença devido tanto à mecanismos de virulência (proliferação das leveduras para diversos órgãos) como por mecanismos imunológicos do hospedeiro (inflamação crônica).

No caso de fungos patogênicos, pode-se considerar como fatores de virulência alguns componentes da parede celular como, por exemplo, o  $\alpha$ -(1,3)-glucan (SAN-BLAS & VERNET, 1977); moléculas de adesão aos tecidos do hospedeiro (VARTIVARIAN, 1992), observadas em leveduras de *P. brasiliensis*, bem como em outros fungos dimórficos como *B. dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* e *Cryptococcus neoformans* (JIMENEZ-LUCHO et al., 1990; KLEIN et al., 1993); produção de enzimas como proteinases, lípases e fosforilases, importantes para a nutrição e invasão do fungo nos tecidos (ODDS, 1985; RUCHEL, 1986). Em *P. brasiliensis*, por exemplo, foi verificado que uma fração da glicoproteína GP43 possui atividade proteolítica sobre o colágeno, elastina e caseína (MENDES-GIANINNI et al., 1990).

A glicoproteína imunodominante GP43 trata-se de um antígeno reconhecido pelo soro da maioria dos pacientes com PCM (PUCCIA et al., 1991). Conforme o paciente responde ao tratamento os títulos de anticorpos anti GP43 diminuem. Esta glicoproteína é tida como fator de virulência devido a sua propriedade adesina (VICENTINI et al., 1994). MORAIS et al (2000) observaram grande polimorfismo do gene codificador da GP43 entre diferentes isolados. O mesmo foi observado por Matute et al (2006), indicando uma seleção Darwiniana Positiva sobre esta seqüência, ou seja, mutações não se mostram desfavoráveis, mas pelo contrário, são mantidas na população. Especula-se que as mudanças expressas neste gene são rapidamente fixadas devido ao fato de que antígenos de superfície de

parasitas tendem a sofrer Seleção Positiva mais forte do que outros genes, podendo resultar em um escape ao reconhecimento imunológico do hospedeiro (KOUFOPANOOU et al., 2001).

Receptores para hormônios também são considerados fatores de virulência, sugerindo a influência de um metabolismo (do hospedeiro) sobre o outro (do patógeno) (FELDMAN et al., 1982). Sabe-se que o crescimento do fungo dimórfico *Coccidioides immitis* pode ser estimulado por hormônios como testosterona e progesterona e inibido por seus precursores (ergosterol e colesterol) (DRUTZ & HUPPERT, 1983; DRUTZ et al., 1981). Uma evidência de que os hormônios podem afetar o padrão de virulência do *P. brasiliensis* é a inibição da transição de micélio para levedura por hormônios femininos (estrógenos) (ARISTIZABAL et al., 1998).

Com relação à transição micélio-levedura, os fatores termo tolerância e dimorfismo também são considerados fatores de virulência (KUROKAWA et al. 1998). A habilidade de se reproduzir a 37°C parece ser comum entre os fungos patogênicos dimórficos, como em *C. neoformans*, *H. capsulatum* e *Sporothrix schenckii*. Foi observado que maioria dos isolados de *C. neoformans var. gatii*, que não crescem de maneira eficiente a 37°C não são capazes de produzir infecção fatal em ratos (KWON-CHUNG, 1979; RHODES, 1988). Cepas de baixa virulência de *H. capsulatum* levam um tempo maior para o processo de transição micélio-levedura do que aquelas cepas mais virulentas, nas quais a transição se dá de forma mais rápida (MEDOFF et al., 1986). Pequenas diferenças de tolerância térmica poderiam desempenhar um importante papel no potencial patogênico do fungo. O dimorfismo (dependente de temperatura e/ou nutrientes) também facilitaria a instalação e dispersão do fungo nos diferentes tecidos do hospedeiro (KUROKAWA et al. 1998). No caso do *P. brasiliensis*, além da variável temperatura, fatores nutricionais também podem influenciar a transição micélio-levedura (VILLAR et al., 1988).



Durante a transição de micélio para levedura em *P. brasiliensis*, ocorrem inúmeras mudanças morfológicas que se devem à inibição e indução de determinadas proteínas (DA SILVA et al., 1994). A identificação das alterações moleculares durante os estágios iniciais da diferenciação celular pode ser importante para a caracterização de proteínas que provavelmente estão relacionadas ao dimorfismo. Sabe-se, por exemplo, que ocorre um aumento na produção de proteínas de 71 e 72Kda nos isolados Pb01 e Pb166 durante a transição de micélio para levedura (SALEM-IZACC et al., 1997). Existem diferentes proteínas sendo produzidas durante as duas fases (micelial e leveduriforme) do *P. brasiliensis*, sendo interessante notar que a produção destas proteínas pode variar dentre diferentes isolados. Neste mesmo trabalho observou-se certa variação morfológica entre os isolados durante a fase leveduriforme (Pb18, Pb166 e Pb2052 apresentaram células alongadas com brotamentos, Pb113 e Pb 662 apresentaram, mesmo à temperatura de 36°C, filamentos similares ao micélio). Esta variação também foi observada na síntese de diferentes proteínas a 36°C, sendo proposto um dendograma.

Outros estudos bastante avançados, como transcriptoma, vêm sendo realizados na tentativa de identificar genes expressos durante as duas fases morfológicas do *P. brasiliensis* (FELIPE et al., 2003 GOLDMAN et al., 2003). Além de identificarem genes de virulência homólogos a alguns genes de *Candida albicans*, identificaram vários genes que poderiam desenvolver papel importante no termodimorfismo, mais especificamente na transição de micélio para levedura, como por exemplo, genes envolvidos na síntese da quitina, constituinte da parede celular cuja produção aumenta na fase leveduriforme (BORGES-WALMSLEY et al. 2002; GOLDMAN et al., 2003). A expressão de genes codificadores de proteínas de choque térmico (HSP) também foi estudada, sendo identificado certa similaridade com os genes hsp de *S. cerevisiae* (GOLDMAN et al., 2003). Neste trabalho estudou-se de forma comparativa a produção de HSPs (HSP70, 82 e 104)

durante a transição micélio-levedura e levedura-micélio, sendo que para o primeiro processo houve um aumento da expressão destes genes 5 horas após o aumento de temperatura, para o segundo processo a expressão caiu subitamente entre 5 e 10 horas após a diminuição da temperatura, tendo um pequeno aumento após 24 horas. De maneira geral estes genes parecem ser mais expressos na fase leveduriforme do que na micelial, desempenhando um importante papel durante a transição. Isso foi também observado por Da Silva et al (1999) que registraram uma expressão diferencial do gene hsp70 em micélio e levedura, observando um processamento (“splicing” dos dois introns) mais eficiente do RNA mensageiro em leveduras, o que explicaria a maior produção da proteína nesta forma do que em micélio.

Frente a esses dados, conclui-se que genes hsp devem desempenhar importante papel para o dimorfismo e termotolerância que, como já descrito, são fatores de virulência essenciais nas mudanças adaptativas necessárias para garantir a sobrevivência do patógeno no tecido de seu hospedeiro homeotermo, sejam tatus ou seres humanos (FRANCO, 1987).

#### **I.4 Proteínas do Choque Térmico**

As proteínas do choque térmico estão presentes em todos os organismos, desde bactérias e leveduras até seres humanos. Elas ocorrem em várias formas e são categorizadas em famílias de acordo com seu peso molecular. Há fortes evidências de que as HSPs desempenham papéis fisiológicos importantes tanto em condições normais como em situações de estresses térmicos ou químicos. As HSPs estão presentes em procariotos e eucariotos e seu alto nível de conservação sugere o desempenho de um papel essencial no processo celular (KREGEL, 2002).

As HSPs foram primeiramente descobertas em larvas de *D. melanogaster* (RITOSSA, 1962) expostas a um choque térmico e, nos últimos 30 anos, um grande número de proteínas de choque térmico vêm sendo descritas nos mais diversos organismos.

A massa molecular das HSPs varia de aproximadamente 15 a 110KDa, sendo divididas em grupos conforme seu tamanho e função. Elas estão presentes no citoplasma, mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo. Estas localizações variam conforme a proteína.

Algumas dessas HSPs, hoje também conhecidas como chaperonas moleculares, possuem sua estrutura altamente conservada tanto nas células procarióticas como eucarióticas. A principal função dessas chaperonas é catalisar o dobramento de outras proteínas, para que elas adquiram conformação tridimensional tornando-se proteínas funcionais, além de estabilizar proteínas durante seu transporte para diferentes organelas. Por exemplo, as proteínas da família HSP70 estabilizam cadeias polipeptídicas não dobradas durante a tradução e durante o transporte para mitocôndria e retículo endoplasmático, prevenindo a agregação da cadeia polipeptídica, já membros da família das HSP60 facilitam o dobramento da cadeia polipeptídica. Em *E. coli*, estas duas proteínas parecem ter ações seqüenciais (primeiramente a proteína recém sintetizada no ribossomo é estabilizada pela HSP70 para depois ser transferida para a HSP60 dentro da qual ocorre o dobramento protéico) (COOPER, 2002).

A família HSP70 comporta várias chaperonas moleculares com duas regiões conservadas, a região ATPase N-Terminal e o domínio C-terminal de ligação à proteína. Em muitos organismos a HSP70 constitui uma grande família de proteínas que podem ser encontradas na maioria dos compartimentos da célula eucariótica. A HSP70 se liga às pequenas regiões hidrofóbicas de polipeptídeos não dobrados, prevenindo sua agregação.

Elas também dão assistência a certas proteínas, ajudando no dobramento de forma dependente de ATP (NICOLA et al., 2005).

A família HSP70, considerada a mais sensível ao aumento de temperatura, é uma das HSPs mais conservada, demonstrando cerca de 60-80% de identidade dentre células eucarióticas (BARDWELL & CRAIG, 1984; LINDQUIST, 1986).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, HSP70s citosólicas são de extrema importância para o ciclo celular (GILBERT et al., 2003). De fato estas proteínas desempenham importante papel no desenvolvimento celular, por estabilizarem produtos de proteínas de genes que são “ligados ou desligados” durante a diferenciação celular, que no *P. brasiliensis*, se dá no período de transição de micélio para levedura (DA SILVA et al., 1999).

Em *P. brasiliensis*, a família HSP70 foi a mais estudada, com quatro membros já descritos. O gene *hsp70* codifica uma HSP70 citosólica ortóloga e similar às proteínas Ssa de *S. cerevisiae*. São tidas como ortólogas pois se tratam de cópias do mesmo gene, do mesmo locus, e não de genes também homólogos e produzidos por duplicação gênica porém localizados em loci diferentes (parálogos). Dois outros genes *hsp70* foram caracterizados por Florez et al (2003). Outra HSP70 descrita em *P. brasiliensis* foi a HSP 87-kDa, cuja expressão era induzida pelo choque térmico a 42°C ou durante a transição M-L. Esta HSP foi primeiramente reconhecida como alvo específico para anticorpos monoclonais contra HSP80 de *H. capsulatum*. Apesar do peso molecular diferente, o sequenciamento direto da cadeia de aminoácidos mostrou alta similaridade com HSP70 (DIEZ et al., 2002, 2003).

Estudos sobre a expressão da HSP70 de *H. capsulatum* foram feitos em isolados com diferentes níveis de patogenicidade e termotolerância. Observou-se que o gene é mais expresso durante a fase leveduriforme do fungo (a 36°C) e que os baixos níveis de

transcrição deste gene poderiam estar associados à alta sensibilidade à temperatura e baixos padrões de virulência (CARUSO et al., 1987).

A expressão diferencial do gene codificador da proteína HSP70 também foi estudada em *P. brasiliensis*. Técnicas de western blot comprovaram uma maior produção da proteína na levedura do que no micélio. A proteína foi seqüenciada e comparada às HSPs70 de outros organismos, apresentando 89,2% de similaridade com a HSP70 de *H. capsulatum*, 73,6% com a de *Blastocladiella emersonii* (fungo aquático), 73,3% com a de *S. cerevisiae* e 63,9% com a de seres humanos. A seqüência de DNA do gene permitiu a identificação de dois introns e o estudo do processamento do RNA mensageiro durante o aumento de temperatura, através de RT-PCR, mostrou um processamento mais eficiente do mesmo durante a fase leveduriforme (36 - 42°C), na qual o “splicing” destes introns parece ser mais eficaz do que na fase micelial (25 - 36°C) (DA SILVA et al., 1999).

A importância das HSPs durante o “splicing” de RNA mensageiro já foi ressaltada anteriormente em *D. melanogaster* (YOST & LINDQUIST, 1986 e 1988), na qual a expressão do gene *hsp82* (gene que contém introns) é reduzida devido ao não “splicing” do RNA em altas temperaturas. Outros genes *hsp* que não possuem introns não tiveram sua expressão alterada. O bloqueio do “splicing” em altas temperaturas também foi observado para genes não pertencentes às famílias HSP de *D. melanogaster*.

Em *S. cerevisiae* o “splicing” de precursores RNA mensageiro também é prejudicado pelo aumento de temperatura. Estudos indicam um grande grau de especialização das funções protetoras das HSPs, algumas delas, como membros da família HSP70 e HSP82, ajudam a manter normal o processo celular em altas temperaturas, outras como as HSP104, facilitam a recuperação do processo de “splicing” uma vez que este foi rompido pelo choque térmico. (YOST & LINDQUIST, 1991).

## **I.5 Importância imunológica das HSPs**

Além da significativa importância para a fisiologia celular, essas proteínas também apresentam grande importância imunológica, sendo capazes de induzir respostas pró-inflamatórias.

As HSPs são, tradicionalmente, tidas como moléculas intracelulares, liberadas das células em condições de necrose e morte celular. Porém essas proteínas podem ser encontradas na circulação de indivíduos normais (TSAN & GAO, 2004).

As HSPs 60, 70 e 90 são frequentemente associadas com autoimunidade, apresentação de antígenos e imunidade inata. As HSPs bacterianas (60 e 70), por exemplo, são consideradas altamente imunogênicas devido à ativação de células T (ZUGEL & KAUFMAN, 1999a). Porém os anticorpos produzidos e as células T também acabam reconhecendo HSP 60 e 70 de mamíferos, indicando reação cruzada e implicações em processos autoimunes (KISSLING et al. 1991).

As HSPs citosólicas, como a 70 e 90, se ligam a peptídeos antigênicos, gerados dentro das células, e fazem parte da via endógena de apresentação de antígenos pelo MHCI (Complexo de Histocompatibilidade Principal de Classe I) (TSAN & GAO, 2004).

As HSPs também são tidas como ativadoras do sistema imune inato. Preparações de HSPs induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como, TNF alfa, Interleucinas 1, 6 e 12, bem como a liberação de óxido nítrico e quimiocinas por monócitos, macrófagos e células dendríticas (TSAN & GAO, 2004).

As HSPs podem estar presentes no meio extracelular e a reação a estas proteínas não necessariamente reflete resposta inflamatória adversa, sendo que a reação contra as próprias HSP pode regular o processo patogênico, sugerindo um importante papel das HSPs como agentes terapêuticos. De fato o sistema imune reage contra antígenos próprios. Esta

auto-imunidade natural é benigna e é restrita a poucos antígenos, dentre os quais se destacam as HSPs. Recentemente, o uso de HSPs vem sendo estudado no tratamento de doenças autoimunes, como por exemplo, o uso da HSP60 no tratamento da diabetes tipo 1 (SCHWARTZ & COHEN, 2000). Segundo estes autores, a auto-imunidade pode beneficiar o equilíbrio e manutenção do próprio (“self”). Assim, o tratamento de uma doença auto-imune deve consistir em ativação (por vacinas, por exemplo) dos mecanismos regulatórios ao invés de suprimir os clones auto-imunes. A vacinação ativaria o sistema imune a controlar seus próprios clones auto-imunes (COHEN, 2002).

As HSPs vêm sendo frequentemente reconhecidas como antígenos imunodominantes em processos infecciosos. Isto surpreendentemente contraria o conceito de que a resposta imune é primariamente dirigida contra antígenos microbianos específicos (BURNIE et al. 2006). Sabe-se, por exemplo, que proteínas das famílias HSP60 e HSP70 são moléculas imunodominantes importantes na resposta imune contra microrganismos, elas atuam como proteínas imunomoduladoras e de sinalização intercelular, tendo efeitos imunológicos como secreção de citocinas. A HSP60, por exemplo, parece induzir o aumento da produção de IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-12 e IL-15, bem como o aumento de produção de IL-6 por células endoteliais vasculares e em células musculares de rato (POCKLEY, 2001). HSPs70 são consideradas importantes fatores alergênicos em *Malassezia sympodialis* (ANDERSON et al., 2004), e importantes antígenos em muitos outros patógenos (MARESCA & KOBAYASHI, 1994).

Em um processo infeccioso, tanto as células do patógeno como as do hospedeiro passam por alterações dramáticas. O aumento de temperatura e a resposta imune são fatores prejudiciais para o patógeno, sendo que a síntese de HSPs é essencial para a sobrevivência do mesmo. Partes destas proteínas provenientes do patógeno são apresentadas por células do hospedeiro, promovendo o reconhecimento de células infectadas pelo sistema imune.

Embora o exato papel das HSPs na imunidade à infecções microbianas não esteja completamente clara, as HSPs, aparentemente, servem como importantes antígenos na defesa contra agentes infecciosos. De fato, a resposta imune às HSPs tem sido observada em doenças infecciosas produzidas por bactérias, protozoários, fungos e nematóides (ZUGEL & KAUFMAN, 1999b). Evidentemente, devido a sua alta conservação dentre os vários microrganismos patogênicos, as HSPs são consideradas antígenos principais, sendo capazes de produzir imunidade humoral e celular em várias infecções.

Pelo menos dois fatos contribuem para a antigenicidade das HSPs: primeiro, estas proteínas são abundantes nos patógenos, especialmente sob condições de estresse e segundo, a memória imunológica para a ocorrência de reações cruzadas é gerada durante a vida do hospedeiro, conforme o contato e constante re-estimulação do sistema imune com microrganismos de diferentes graus de virulência. Sendo assim, a infecção de um indivíduo com um patógeno virulento permitiria que o sistema imune, previamente preparado, reagisse mais rapidamente, antes mesmo de ocorrer uma resposta à antígenos verdadeiramente espécie-específicos (ZUGEL & KAUFMAN, 1999b).

Esta importância imunológica pode ser de grande utilidade para o desenvolvimento de vacinas. Um exemplo desta aplicação foi o desenvolvimento de uma vacina de DNA, usando o gene do choque térmico *hsp65*, contra tuberculose (LIMA et al., 2003).

GOMEZ et al (1995) deduziram a seqüência de aminoácidos da proteína HIS-62 (uma glicoproteína de parede e membrana celular) de *H. capsulatum* e observaram similaridade de 70 e 50%, entre a HSP60 de *S. cerevisiae* e *E. coli* respectivamente, considerando a HIS-62 como um membro das HSP60. Após o isolamento de um fragmento do gene por PCR, o mesmo foi clonado em *E. coli*, sendo que a proteína recombinante



exerceu atividade imunológica similar, se não idêntica, à proteína nativa, conferindo proteção contra a infecção intranasal com células leveduriformes de *H. capsulatum*.

Estudos de resposta celular imune contra *H. capsulatum* também foram realizados com a HSP70 recombinante. A seqüência deduzida de aminoácidos do gene mostrou, respectivamente, similaridade de 71 e 76% com HSP70 de humanos e *S. cerevisiae*. A proteína recombinante induziu, em ratos, resposta imune celular, mas não promoveu resposta imune protetora.

Bisio et al (2005) clonaram, caracterizaram e expressaram em *E.coli* um cDNA membro da família HSP70 de *P. brasiliensis*. A proteína recombinante reagiu com anticorpo policlonal de coelho contra HSP70. Experimentos de western immunoblot demonstraram que o soro de pacientes com paracoccidiodomicose reconhece a proteína recombinante purificada. A análise de antigenicidade da HSP70 detectou três peptídeos internos que poderiam agir como ativadores de proliferação de células T.

Thomas et al (1997) clonaram, sequenciaram e expressaram uma HSP60 de *C. immitis*. A proteína recombinante foi utilizada para imunizar camundongos, demonstrando um aumento na proliferação de células T.

Com relação ao gene *hsp60* de *P. brasiliensis*, já foram realizadas clonagem, caracterização e expressão da proteína por ele codificada. A proteína recombinante reagiu com anticorpo monoclonal (contra HSP60 de humano) de rato. Experimentos de western immunoblot demonstraram que tanto a proteína HSP60 nativa como a recombinante são reconhecidas pelo soro de pacientes com paracoccidiodomicose (IZACC et al., 2001). Outros estudos demonstraram a ausência de reação cruzada desta proteína recombinante com o soro de pacientes com aspergilose, esporotricose, criptococose e tuberculose. A reação foi observada no soro de 9,52% do controle de indivíduos sadios e em 11,5% dos pacientes com histoplasmose. A alta sensibilidade e especificidade para HSP60 sugerem que

a proteína recombinante pode ser usada associada ou não com outros antígenos recombinantes para a detecção de anticorpos contra *P. brasiliensis* em indivíduos infectados (CUNHA et al., 2002).

## **I.6 Uso de genes hsp70 em inferências filogenéticas**

Como as HSPs, em especial as da família HSP70, se mostram altamente conservadas, elas vêm sendo usadas em inferências filogenéticas entre grandes grupos, como por exemplo archaeobacteria, eubacteria e eucariotos. Segundo a análise de genes ribossomais cada um destes três grupos são tidos monofiléticos e distantes uns dos outros. Adicionalmente, árvores filogenéticas de famílias de genes duplicados sugeriram que a célula eucariótica tenha evoluído a partir de um ancestral de archaeobacteria. Porém estas hipóteses não parecem ser sustentadas pela análise de seqüências protéicas altamente conservadas, como por exemplo, a HSP70, cujo estudo comparativo para estes 3 grupos revelou agrupamento filogenético de archaeobacteria com eubacteria Gram-positivas, enquanto que seqüências eucarióticas se mostraram mais próximas de eubactérias Gram-negativas (GUPTA & SINGH, 1994).

Análises filogenéticas da HSP70 também sustentam a hipótese de origem monofilética dos metazoários, bem como reforçam a relação de proximidade filogenética entre fungos e animais (BORCHIELLINI et al., 1998).

Apesar de genes conservados, como os codificadores das HSPs, serem amplamente usados em análises filogenéticas de organismos distantes, um fator limitante deste uso é a paralogia (MARTIN & BURG, 2002). Sabe-se que famílias de genes evoluíram através de uma série de duplicações gênicas, portanto o uso do termo homologia para estes casos se torna um tanto grosseiro. É necessário diferenciar os genes destas

famílias em ortólogos e parálogos. Genes ortólogos, em um conjunto de duplicatas, são duas cópias do mesmo gene, do mesmo locus; genes parálogos são dois genes, também homólogos, porém em loci diferentes. Inferências filogenéticas devem ser baseadas em genes ortólogos, mas pode haver perda de genes ao longo da evolução e erroneamente genes parálogos são comparados, quando isso ocorre, a árvore gênica ou genealogia de genes difere da árvore de espécies (filogenia) (RIDLEY, 2006).

O uso do gene hsp70 para inferências filogenéticas nem sempre se mostra similar às inferências baseadas em outros genes. Segundo um estudo realizado com diferentes grupos de tubarões, embora o alto grau de conservação do hsp70 faça deste gene um importante candidato para uso em análises filogenéticas e evolutivas, ganhos e perdas de genes individuais ao longo do tempo evolutivo aumenta a chance de que genes amostrados sejam parálogos, comprometendo a filogenia (MARTIN & BURGO, 2002).

## II Proposta do projeto de mestrado

Tendo as informações acima referidas, juntamente com os dados de variações de virulência entre os diferentes isolados de *P. brasiliensis*, é de essencial importância o entendimento a respeito da relação que a expressão de genes do choque térmico pode ter com os diferentes padrões de virulência, bem como com os diferentes perfis de dimorfismo, observados em nosso laboratório. Estes genes poderiam ser expressos de maneira diferencial entre os diferentes isolados (clínicos e provenientes de tatus)?

Além da virulência, outras características que também variam dentre os isolados são a morfologia e a temperatura de transição morfológica. Theodoro et al (2002), estudando a morfologia microscópica de 15 isolados de *P. brasiliensis*, em nosso laboratório, durante a diminuição de temperatura de 36°C para 25°C (o fungo foi primeiramente mantido a 36°C em fase leveduriforme, após quinze dias foi feito um novo cultivo diminuindo-se a temperatura para 35°C, e assim sucessivamente até 25°C), observaram ampla variação morfológica entre os isolados a 36°C (fase leveduriforme) e diferentes respostas à diminuição de temperatura. As características analisadas para tal comparação foram: tamanho e formato das células (alongado ou arredondado) e presença de brotamentos. Um fator importante e bastante variável entre as cepas foi a temperatura em que cada uma passava da fase leveduriforme para a micelial. A maioria dos isolados começou a apresentar formação de hifas entre as temperaturas de 30 a 28°C, sendo que dois extremos foram observados: o isolado Bt85, já apresentava hifas a 33°C, e o isolado T13LN1 que começou sua transformação a 27°C.

Essa diversidade morfológica e de virulência poderia ter alguma relação com termotolerância e conseqüentemente com a produção de proteínas do choque térmico? Se sim, a variação estaria presente na seqüência de nucleotídeos do gene? Ou então a variação

estaria presente no processamento do RNAm em diferentes temperaturas nos diferentes isolados, o que poderia refletir em uma maior ou menor expressão gênica?

A fim de elucidar melhor estas questões, o presente projeto de mestrado teve como objetivo o estudo das variações morfológicas dos diferentes isolados, durante a transição de micélio para levedura e durante o choque térmico até 42°C, bem como de suas possíveis causas moleculares no que diz respeito ao gene hsp70 (sua seqüência parcial e expressão).

O melhor conhecimento da diversidade dos isolados de *P. brasiliensis* e, em particular das variações fenotípicas do dimorfismo e sua base genética, poderá ser importante para um melhor esclarecimento a respeito da disseminação deste patógeno, podendo de alguma maneira ser correlacionadas à adaptação parasitária aos tecidos de seus hospedeiros (homem e tatu *Dasypus novemcinctus*). O estudo da expressão do gene hsp70 de forma comparativa em diferentes isolados pode ser de grande utilidade para trabalhos que visam o desenvolvimento de vacinas a base de DNA ou proteínas HSPs recombinantes.

Por ser um gene de importante expressão na condição de parasitismo, este estudo pretendeu elucidar as possíveis relações entre a expressão de genes hsps, em especial o hsp70, com diferentes perfis de dimorfismo/ termo tolerância e de virulência dos isolados (dado já obtido em nosso laboratório para alguns dos isolados estudados).

## **II.1 Objetivos**

- Caracterizar morfológicamente os isolados quanto a morfometria de leveduras, transição micélio-levedura (M-L) (temperatura e tempo de transição) e termo tolerância;
- estudar a expressão do gene codificador da HSP70 por Real Time RT-PCR;
- analisar o polimorfismo de restrição por PCR – RFLP do gene codificador da HSP70;
- sequenciar regiões contendo os introns 1 e 2 do gene hsp70,
- comparar os dados morfológicos, fisiológicos e moleculares com os dados de virulência dos isolados.

### III Resumo

O fungo termo dimórfico, *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), a micose sistêmica mais prevalente da América Latina. Este fungo vem sendo frequentemente isolado de amostras clínicas, tecidos de tatu (*Dasybus novemcinctus*) e recentemente foi também isolado de cão. Este trabalho avaliou a transição de micélio para levedura (M-L), a termo tolerância e o perfil de virulência em nove isolados de *P. brasiliensis* (quatro de pacientes humanos, quatro de tatus e um de cão), bem como a sua relação com a seqüência parcial e expressão do gene hsp70 (Heat Shock Protein 70) através de Real Time RT-PCR. Tanto os dados morfológicos como moleculares se mostraram variáveis dentre os diferentes isolados. Alguns destes dados, como sequenciamento e morfologia leveduriforme corroboram com a divisão de nossos isolados nas duas espécies crípticas simpátricas previamente propostas por Matute et al (2006). Nossos resultados confirmam que a HSP70 pode ser um importante fator de virulência por estar associado à termo tolerância, mas sua expressão parece não ser diretamente associada a altos padrões de virulência.

**Palavras-chave:** *Paracoccidioides brasiliensis*, HSP70, expressão, espécies crípticas.

#### IV Artigo:

##### Title

### **Dimorphism, thermo tolerance, virulence and Heat Shock Protein 70 expression in two cryptic species of *Paracoccidioides brasiliensis***

Raquel Cordeiro Theodoro<sup>1</sup>, Sandra de Moraes Gimenes Bosco<sup>1</sup>, Severino Assis da Graça Macoris<sup>1</sup>, João Pessoa Araújo Jr<sup>1</sup>, João Manuel Grisi Candeias<sup>1</sup>, Luzia Aparecida Trinca<sup>2</sup>, Ivan de Godoy Maia<sup>3</sup>, Eduardo Bagagli<sup>1</sup>

1 Depto. de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências, Unesp-Botucatu

2 Depto. de Bioestatística do Instituto de Biociências, Unesp-Botucatu

3 Depto. de Genética do Instituto de Biociências, Unesp-Botucatu

RCT: [raquel@ibb.unesp.br](mailto:raquel@ibb.unesp.br)

SMGB: [smgbosco@ibb.unesp.br](mailto:smgbosco@ibb.unesp.br)

SAGM: [massis@ibb.unesp.br](mailto:massis@ibb.unesp.br)

JPAJr.: [jpessoa@ibb.unesp.br](mailto:jpessoa@ibb.unesp.br)

JMGC: [candeias@ibb.unesp.br](mailto:candeias@ibb.unesp.br)

LAT: [ltrinca@ibb.unesp.br](mailto:ltrinca@ibb.unesp.br)

IGM: [igmaia@ibb.unesp.br](mailto:igmaia@ibb.unesp.br)

EB: [bagagli@ibb.unesp.br](mailto:bagagli@ibb.unesp.br)

corresponding autor: Eduardo Bagagli

Depto. de Microbiologia e Imunologia

Instituto de Biociências de Botucatu –IBB

UNESP-Botucatu

Distrito de Rubião Júnior, s/n

Botucatu-SP-Brasil

CEP: 18618-000

Phone +55 14 3811-6058

Fax +55 14 3815-3744



## **Abstract**

**Background:** The thermo dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the etiological agent of Paracoccidioidomycosis (PCM), the most prevalent systemic mycosis in Latin America. The previous phylogenetic species recognition proved the existence of, at least, three cryptic species in this pathogen. In this work we evaluated the mycelia to yeast (M-Y) transition, thermo tolerance and virulence profiles of nine isolates of *P. brasiliensis*, (including members of two of the three species) as well as its relation to the partial sequence and expression of hsp70 gene.

**Results:** It was observed a large phenotypic variability concerning the M-Y transition. The isolates Bt84 and T10 took more time to convert to the yeast form. These same isolates presented stretched yeast cells at 36°C, instead of the typical round cells. It was also observed arthroconidia production during the M-Y transition for some of the nine isolates studied. The hsp70 expression showed to be variable among our isolates. The partial sequencing of hsp70 gene resulted in a Neighbour Joining tree that divided our isolates in two main groups.

**Conclusions:** Our data confirm that hsp70 gene might be an important virulence factor, associated with the thermo tolerance, but its expression does not seem to be directly related to high virulence profiles. We also presented some preliminary results about mycological characters that could be important candidates for morphologic markers for species recognition, as well as the partial sequencing of one member of the hsp70 gene family that allowed the separation of our isolates in two clusters, that correspond to the two sympatric cryptic species that occur in our PCM hyper endemic area (Botucatu, SP, Brazil).

Key-words: *Paracoccidioides brasiliensis*, hsp70 expression, dimorphism and cryptic species.

## **Background**

*P. brasiliensis* is the etiologic agent of PCM, the most important systemic mycosis in Latin America [1]. This pathogen presents a thermo dimorphism, at 25°C it grows as mycelia, producing its infective propagula, and at 36°C as yeast budding cells [2].

This fungus has been frequently isolated from clinical samples and from 9-banded-armadillo, *Dasypus novemcinctus* [3]. It has recently been isolated in a dog in Curitiba, Paraná State, Brazil [4]. The isolate was characterized as *P. brasiliensis* by mycological and molecular techniques [5].

*P. brasiliensis* has been considered, for a long time, as a unique biological entity, mainly because its peculiar microscopic aspects, both in parasitic and culture conditions. This fact, although well accepted for practical purpose and medical diagnostic, has been challenged by several evidences. This fungus presents many variable phenotypes, such as growth, mycelia colony, conidia production, mycelia-yeast transition, yeast microscopy (budding, size and shape of cells), virulence, thermo tolerance, mycelia colony [6, 7] and clinical manifestation [8]. However, no comparative study was carried out using morphologic features associated to molecular data.

Recent studies detected cryptic speciation and recombination in *P. brasiliensis* by gene genealogies indicating that this fungus consists of at least three distinct, previously unrecognized species: S1 (Species 1 from Brazil, Argentina, Paraguay, Peru and Venezuela), PS2 (phylogenetic species 2 from Brazil and Venezuela) and PS3 (phylogenetic species 3 with 21 isolates from Colombia). Two of the three lineages of *P. brasiliensis*, S1 and PS2, are sympatric across their range, suggesting barriers to gene flow other than geographic isolation [9]. Cryptic species have also been detected by gene genealogies in other pathogenic fungi,

such as *Coccidioides immitis* (separated in two species: *C. immitis* and *C. posadasii*) [10] and *Histoplasma capsulatum* (separated in at least seven species) [11].

Since the dimorphism and thermo tolerance are variable and important features for the parasitic establishment of this pathogen, considered as virulence factors, this work aimed to evaluate different profiles of virulence and mycelia to yeast (M-Y) transition in nine isolates of *P. brasiliensis* from at least two cryptic species (S1 and PS2), as well as its relation to the expression of hsp70 (Heat Shock Protein 70) gene by Real Time PCR.

Heat shock proteins are found in all organisms and their production is increased during thermal and chemical stresses. These proteins are known as molecular chaperones; they have a high conserved structure and play an important role on the folding and transporting of the proteins synthesized into the cell [12].

The expression of hsp genes has been already studied during the M-Y transition in *P. brasiliensis*. These proteins are more expressed during the yeast phase than in the mycelia phase [13, 14] and an accumulation of cDNA of the gene hsp70 containing introns during the beginning of M-Y transition was observed [15].

The HSPs also present an immunological role in the induction of pro-inflammatory responses, being frequently considered as immunodominant antigens in infectious diseases [16] and studied as a target for vaccine development. Bisio et al [17] cloned, characterized and expressed a hsp70 cDNA of *P. brasiliensis*. The recombinant protein reacted to polyclonal antibody of rabbit against HSP70 and was recognized by sera from PCM patients.

Since prophylactic or treatment measures must include, preferentially, all genotypes and/or phenotypes of *P. brasiliensis* that cause PCM, the discovery of three cryptic species in *P. brasiliensis*, increased the importance of comparative studies in order to detect some phenotypic differences among the different species. This could have important consequences in how this pathogen interacts with its host as well as with its saprobe environment.

This article reported some mycological and molecular features, concerning the hsp70 gene, that are variable among different isolates of *P. brasiliensis* and may be useful for understanding some evolutionary aspects of this pathogen, such as cryptic species divergence.

## **Results**

**Morphometry of yeast cells at 36°C and M-Y transition:** a boxplot graphic of the area of yeast cells from the nine isolates is presented in figure 1. There was no significant difference, concerning cell size among the isolates. The isolate Pb-cão showed the largest area amplitude, containing cells from  $4\mu\text{m}^2$  to  $1200\mu\text{m}^2$  (or 1,6 to 27,6 $\mu\text{m}$  of diameter). The isolates Bt84 and T10 presented yeast cells with elongated buddings (pseudohyphae-like), instead of the common circular form of the remaining isolates (figure 2). The microscopic evaluation of the transition is presented on Table 2. The isolates T4 and S1 were the first ones to convert mycelia to yeast form. The isolate Bt84 showed completed transition only at 36°C. Unexpected, it was possible to observe a high conidia production, at 30°C, for the isolates Bt85 and S1 (more than 20 conidia per field) and a low production for the isolates T4 and Pb-cão (5 – 15 conidia per field). The isolates T10, T13, Bt84, Pb265 and D01 did not produce conidia at these conditions (figure 3). It was also observed chlamidoconidia during the M-Y transition (figure 4).

**Time for the occurrence of mycelia to yeast transition:** a non-parametric analysis of Krustal-Wallis showed a significant difference between the isolate Bt84 (slow transition) and the remaining isolates ( $p < 0,005$ ). The isolates D01, Pb265, S1 and T4 presented the most mycelia fragments converted to yeast on the fourth day after culture, being considered

isolates of fast transition. The isolates Bt85, Pb-cão, T10 and T13 showed an intermediary transition (Figure 5).

**Thermo tolerance:** a logistic regression was performed for the data about decreasing of viability according to the increasing of temperature. The isolates could be divided in two groups, one containing the isolates Bt84, Bt85, D01 and Pbcão that tended to lose viability more quickly being less thermo tolerant, and other group containing the isolates Pb265, S1, T10, T13 and T4, that showed to be more thermo tolerant (Figure 6).

**Virulence assays:** the data of CFU/g in the testis, spleen and liver were presented in the figure 7 and table 3. The isolates were classified in high virulence (S1, Pbcão, T13 and T10) and low-intermediary virulence (BT85, BT84, Pb265 and T4).

**PCR and RFLP of hsp70 gene:** a PCR fragment of about 2300pb was observed for the nine isolates in agarose gel (Figure 8). No restriction polymorphism was observed for the four enzymes used (data not shown).

**Partial sequencing of hsp70 gene:** 1022 nucleotides were well resolved sequenced for our nine isolates, corresponding to sites 256-844 (sense sequencing) and 1901-2385, (antisense sequencing), considering the same positions of the previous deposited sequence by Da SILVA et al [15] [GenBank: U91560]. It was observed 1 polymorphic informative site in the intron 1, 2 in the intron 2 and 2 in the exon 2. It was also observed 6 polymorphic non-informative sites in the exon 2 and 2 in the exon 3 (Table 4). The nine obtained sequences presented some differences when compared to the sequence deposited at GenBank (from the isolate Pb01), mainly in the intron 1, where our nine sequences showed 4 large gaps: one of 4

nucleotides, another of 16, another of 23 and another of 21. This last one corresponds to a CT microsatellite, observed in the deposited sequence. It was also detected a single nucleotide polymorphism in the anchoring region of the primer HHA, designed for amplification of the intron 1 by Da Silva et al [15], thus explaining the negative amplification of this intron in our isolates (data not shown). The Neighbour Joining tree showed a well resolved divergence between one group containing the isolates Bt84 and T10 (PS2 species of Matute et al [9]) and the remaining ones (S1 species of Matute et al [9]) (Figure 9).

**PCR of DNA and cDNA with the primers designed for Real Time PCR:** the amplification product of hsp70, alpha and beta tubulins from cDNA presented a fragment of about 50bp. The amplicons fragments of hsp70 and alpha tubulin, from DNA samples, were about 100bp due to the presence of introns between the sites from where the primers were designed (Figure 10).

**Relative quantification of hsp70 gene expression:** all the Real Time PCRs presented dissociation curves of a unique peak. Since the efficiency values of the three primer pairs were very similar (1.9645 for HSP70, 2.008 for alpha tubulin and 1.9763 for beta tubulin), it was used the QR values for relative quantification of hsp70 expression in all isolates. The calibrator gene used for QR calculation, presented in the figure 11, was the alpha tubulin. The isolates T13, Pb265 and D01 presented high levels of hsp70 gene expression after the increasing of temperature (major than 13x) and the remaining isolates had an increase of hsp70 expression of 2.54 to 5.61x.

## **Discussion**

The discovery of three cryptic species in *P. brasiliensis*, by gene genealogies [9] increased the importance of comparative studies in order to detect some phenotypic differences among isolates belonging to the different species, in order to understand the meaning of such features for species divergence. If the species are genetically separate, they are supposed to accumulate some morphologic differences, which may result in the exploration of new ecological niches or in different strategies for survival in saprobe or host environment.

In this work we used nine isolates of *P. brasiliensis*: two (T10 and Bt84) from PS2 species, two (T13 and T4) from S1 species and five with no species identification in order to evaluated phenotypic and molecular variation among different isolates.

The dimorphism and thermo tolerance are considered virulence factors that are important for the adaptation of the pathogen to the host environmental conditions, such as high temperature, hormones influence and immune response [18]. Different profiles of dimorphism and thermo tolerance could result in distinct pathogen-host interactions, such as different virulence degrees or different clinical aspects. Some virulence factors, such as dimorphism, could reflect a natural selection resultant of the interaction of two genotypes: pathogen and host [19]. Recently some evidences have been supported the hypothesis that virulence and pathogenicity features could be developed from saprobe environment (such as soil), through the interaction of these pathogens with phagocytic and predator microorganisms. So, one adaptable characteristic could perform different roles during the saprophytic and parasitic phases [20, 21, 22]. The HSP70 protein, that is considered an important feature for virulence, is associated to others functions on cell physiology in saprobe

conditions that do not imply directly in pathogenicity. Then virulence and pathogenicity could be actually a consequence, instead of a cause, of gene expression

Although there was no significant difference among the nine isolates concerning yeast size, the morphometry of cells at 36°C showed a great phenotypic plasticity. The larger diameter amplitude was observed in the isolate Pb-cão. This isolate has also an unusual characteristic: its yeast colony does not present the typical brain-like aspect, but it presents a smooth consistence and its growth is very low when compared to the others *P. brasiliensis* isolates (data not shown).

The shape of yeast cells was also a variable character. In most isolates, it looks like a circumference. However the isolate Bt84 presented excessively elongated yeast cells, similar to pseudo hyphae. It was also observed elongated buddings in the isolate T10, but additional analysis, using more isolates from PS2 and from the two others species, are necessary for elucidate the significance of this feature as phenotypic diagnostic.

It was observed a large phenotypic variability concerning the M-Y transition and thermo tolerance among the isolates. The isolates Bt84 and T10 presented no signal of M-Y transition at 32°C and the isolate Bt84 was the last one to convert to yeast form (complete transition at 36°C and slow transition according to table 2 and figure 5 respectively). It was speculated that the slow M-Y transition could be due to the “difficulty or low capacity” of these isolates in acquiring the round shape of the yeast cell.

The arthroconidia production was an unexpected result observed during the M-Y transition assay, since several studies have pointed to the difficulty in obtaining this propagula in laboratory (under special conditions, such as 22°C and low availability of nutrients) [23]. However, the experimental conditions applied were the opposite from the last ones (30°C and a relatively rich media). Maybe the high temperature was a stress factor that induced the arthroconidia production.



The arthroconidia production seemed to be even more exuberant in Soil Extract Agar Media [24]. According to others studies developed in our lab, almost all isolates can produce conidia in Soil Extract Agar Media, in distinct quantities. The isolates Bt84 and T10 were the only isolates that did not present any conidia in this medium.

The chlamidoconidia are round and intercalary conidia with a thick cell wall. Their production is raised during the increasing of temperature to 36°C [25], but their identification is very difficult since they can be easily mistaken for yeast cells. San Blas et al [26] described four steps in the M-Y transition that could be observed in our assay: the first consist just of mycelia forms with or without chlamidoconidia, the second of yeast-like structures, the third of yeast cells in a chain and the fourth of free and multi budding yeast cells.

About the molecular data, it was observed, as already expected, little polymorphism in the *hsp70* gene among our nine isolates. Since there was no restriction fragment length polymorphism, it was decided to sequencing the 3' and 5' ends of the gene, including the two introns. The sequencing showed some polymorphism between our nine sequences and the sequence from GenBank [15]. There was a single nucleotide polymorphism located at the anchoring region of HHA primer (antisense primer for the amplification of the intron 1) purposed by Da Silva et al [15], that explain the negative PCR of this intron in our nine isolates (data not shown).

The *hsp70* gene is a member of a gene family that, in *P. brasiliensis* is compound of, at least, four described members [27]. It is known that gene families evolve through several gene duplications, and it is necessary to distinguish between ortholog and paralog genes. Ortholog genes are copies from the same gene and from the same locus. Paralog genes are also homolog genes, but they are from different loci. Phylogenetic inferences must be based on ortholog genes, but some genes can be lost along the time of evolution and paralog genes can

be, erroneously compared. When this mistake happens, the gene tree or gene genealogy differs from phylogenetic tree [28].

The primers, designed by Da Silva et al [15], used for the amplification and sequencing of hsp70 gene are specific for just one member of hsp70 in *P. brasiliensis*, so the sequences here compared are considered ortholog. The differences between the sequences of our nine isolates and the sequence from GenBank, of the isolate Pb01 are explained by the fact that this isolate seems to diverge from others isolates concerning the hsp70 sequence, as already documented by Teixeira et al [29]. This isolate was not evaluated by Matute et al [9]. More comparative studies will be developed in our lab and this isolate will be included.

The phylogenetic analysis of hsp70 gene by Neighbour Joining grouped the isolates T10 and Bt84, corroborating to the previous data obtained in our lab by the sequencing of ITS1-5.8S-ITS2 region [30], that allow the separation of our isolates in two clusters: one containing the isolates T10 and Bt84 (from PS2 species) and other containing the isolates T3, Bt60, T15, Bt85, T13, T4, T5, T8, Pb265, T1, T9 and T7 (from S1 species)

It seems that the genotypes from PS2 species occur in less frequency when compared with the genotypes from S1 species, both from human and armadillos [9]. Particularly, in our armadillo isolates, all from the same hyper endemic area, this proportion is 1:9. Could the few cases of fungal isolation from PS2 species be explained by the low capacity or no production of conidia, the infecting propagula? Could the PS2 genotypes, be associated with infection by traumatic rout, instead the respiratory and more frequent one? More studies, including a bigger number of isolates from the three cryptic species, are still necessary for the identification of morphologic, molecular, physiologic, clinical and ecologic features associated to the species-specific genotypes of *P. brasiliensis*.

Concerning the hsp70 gene expression, the isolates Pb265 and T13 presented the highest transcription of hsp70 after the increasing of temperature. Both isolates also showed

great viability on thermo tolerance analysis. The same could be observed for the isolates T10 and S1 which also presented high hsp70 expression. On the other hand, the isolate T4 that was grouped among the isolates with high thermo tolerance (with S1, T10, Pb265 and T13), presented a low HSP70 expression, and D01 that was classified as low thermo tolerant presented a high HSP expression than some of the isolates belonging to the group of low thermo tolerance.

There was some difficulty to classify the isolates concerning the virulence profiles, since it was analyzed CFU from three different organs in two different periods. Based on table 3, the isolates were classified in two opposite classes, one of high virulence (Pb-cão, T10, T13 e S1) and other of intermediary-low virulence (BT84, BT85, T4 e Pb265). No association was observed between de virulence profiles and hsp70 gene expression, thus denying the initial hypothesis that high levels of hsp70 transcription would be associated to high virulence, as suggested for *Histoplasma capsulatum* [31].

### **Conclusion**

The HSPs play a key role for all cellular organisms, being important targets for evolutionary and physiological studies, and its use for vaccine development seems to be very promissory due to the immunological role of these proteins. The great amplitude of expression and polymorphisms of hsp70 gene found among different isolates pointed to the importance of using more than one isolate, preferentially isolates from the three cryptic species, in studies concerning the evaluation of protector effect of HSPs vaccines, since all *P. brasiliensis* variability must be taken into account for any therapeutic and/or prophylactic measures.

## **Methods**

***P. brasiliensis* isolates and cultures:** four isolates obtained from armadillo (T4, T10, T13 and S1), four from human patients (Bt84, Bt85, Pb265 and D01) and one from dog (Pb-cão) [4] were maintained, both in mycelia and yeast forms, at 25 and 36°C respectively, in Glucose Peptone Yeast Agar (GPYA OXOID Lyd., Basingstoke, UK).

**Morphometry of yeast cells at 36°C and M-Y transition:** microscope slides of yeast cells in the 7<sup>th</sup> day of growth were stained with lactophenol cotton blue. Five random microscopic fields were analyzed with the Leica Qwin V3 software. Two diameter measures of each cell were registered into an excel plan to determine the area, according to the following formula: (diameter 1 x 0,5) x (diameter 2 x 0,5) x 3,1416. The M-Y transition temperature was estimated by slide culturing mycelia fragments in GPY and maintained at 30°C for 15 days (two replicates for each isolate). The same procedure was carried out at 32, 34 and 36°C. The changes were evaluated microscopically, with slides stained with lactophenol cotton blue. The transition temperature was considered when it was possible to observe free yeast cells with buddings.

**Time for the occurrence of mycelia to yeast transition:** four mycelia fragments were sub cultured on GPYA in Petri dishes (5 Petri dishes were prepared for each isolate) and maintained at 36°C. The evaluation of the transition was done macroscopically, noting the time required (in days) to the transition of each mycelia fragment to the yeast phase.

**Thermo tolerance:** four yeast fragments were sub cultured on GPY in Petri dishes (3 Petri dishes were prepared for each isolate) and maintained at 37°C for 15 days. After this

period the same fragments were sub cultured again and maintained at 38°C for 15 days and so on at 39, 40, 41 and 42°C. The lost of viability was evaluated microscopically by counting the number of viable cells (stained by lacto phenol cotton blue, with a regular cell wall). For each isolate and temperature, at least five random microscopic fields were digitalized and analyzed using a Leica Microscopic coupled with Leica Qwin V3 system. .

**Virulence assay:** it was carried out for isolates S1 and Pb-cão, the others isolates were previously studied by Hebelers-Barbosa et al (2003) and Macoris et al (2006) with the same procedures in our laboratory. A suspension with  $8 \times 10^6$  viable yeast cells/mL was used to the animal inoculation. Ten hamsters (age of 2 months) were inoculated intratesticular with 0,2mL of the yeast suspension. The counting of CFU/g (Colony-Forming Units/g) of tissue was carried out at two moments (4 and 8 weeks after the inoculation). The animals were anesthetized with Zoletil (15-20mg/Kg) and necropsied under sterile conditions, and fragments of the liver, spleen and testis were weighted and homogenized in 2mL of phosphate-buffered saline (PBS). A hundred micro liters of this suspension were cultured in Petri dishes with BHI agar (Brain Heart Infusion media) supplied with 4% of horse serum and 5% of growth factor from the yeast culture of the *P. brasiliensis* strain 192 (obtained by a filtered liquid culture of 7 days) [32]. Each organ was cultured in triplicates and maintained at 36°C for 30 days. CFU for each organ of individual hamster was counted, and the CFU per gram of tissue was calculated individually. The results were presented as log<sub>10</sub> of the average value  $\pm$  standard error.

The local Ethical Committee for Animal Research (CEEAA) (Protocols 99/27 and 241) approved the procedure with animals.

**DNA extraction:** it was carried out according to McCullough et al [33], with initial cell disruption with glass beads (425-600 microns, acid washed, Sigma, St Louis, MO, USA) in solution of 1M Sorbitol and 125mM EDTA. The DNA was quantified by agarose gel electrophoresis and diluted in ultra pure water to 10ng/ $\mu$ L.

**PCR of hsp70 gene:** The reactions were carried out in 25  $\mu$ L of reaction mixture [20ng of genomic DNA, 1X PCR buffer (50mM KCl and 10mM Tris HCl), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 10 pmoles of each primer HHB sense (5' CAT CTG CGT TAT ATA CCT 3') e HHC antisense (5'TTA GTC AAC CTC CTC GAC 3') [15] and 1 unit of *Taq* polymerase - Amersham Biosciences], in a thermocycler (MJ Research, Inc, USA). The thermal cycling conditions were: 94°C for 4 min followed by 40 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 2 min and a final cycle of 72°C for 5 min. The PCR products were identified by agarose gel electrophoresis.

**RFLP of PCR products of hsp70 gene:** it was carried out with the endonucleases RsaI, HaeII, Nci e Sty (Promega). The reactions were performed in separated microtubes for each enzyme in a final volume of 20 $\mu$ L (12,3 $\mu$ L of ultra pure water, 2 $\mu$ L of Buffer reaction, 0,2 $\mu$ L of BSA, 5 $\mu$ L of PCR product and 0,5 $\mu$ L of restriction enzyme. The samples were maintained at 37°C for 4h. The fragments were separated by agarose gel electrophoresis stained with Ethidium Bromide.

**Partial sequencing of hsp70 gene:** The PCR amplicons were purified by the commercial kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences) and the sequencing reactions were carried out in both strands in a thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany), according to Big Dye kit (Applied Biosystems)

instructions. The polyacrylamide gel electrophoresis was performed in ABI PRISM® 377 DNA Sequencer, and the chromatogram visualized by the Chromas program. The sequences, from the 5` and 3` of the gene, including the two introns were sent to Blastn to compare with the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). The sense and antisense sequences of the nine isolates were aligned by Clustal W, in Mega 3.1 software. A Neighbour Joining tree was proposed.

**RNA extraction:** the yeast phase was subculture in GPY liquid media (2% glucose, 1% bactopectone and 0,5% yeast extract) and maintained at 25°C for 9 days at 140 rpm. The transition to mycelia phase was confirmed microscopically and the cultures were maintained at 36°C for 5h. The RNA was extracted from culture at 25 and 36°C. The extractions were carried out with Trizol reagent (Invitrogen) according to the supplier`s instructions after disruption of the cells in freezing liquid nitrogen. To remove any residual genomic DNA, the RNA was treated with DNase RQ1 (Promega), during 30 minutes at 37°C.

**cDNA synthesis (RT):** 1µL of *primer* oligo dT (12-18) (Invitrogen), 1µL de dNTP mix 10pM (Amersham Biosciences) and 1µL sterile water treated with DEPC (1%) were added to RNA previously treated with DNase, following the supplier`s instructions. The samples were maintained at 70°C for 10 minutes and at ice for 1 minute. It was added 4µL of 5X Buffer, 1µL of DTT and 200 units of Reverse Transcriptase SuperScript III (Invitrogen). The cDNA was synthesized at 50°C for 1h. The reactions were stopped at 70°C for 15 minutes. The cDNA was mantained at -20°C for posterior use in Real Time PCR.

**Primer design for Real time PCR:** the primers were designed with Primer Express software (Applied Biosystems), for the hsp70 gene (Gen Bank acess number: Pb U91560),

whose sequence was deposited by Da Silva et al (1999) and for the endogenous controls alpha and beta tubulins (sequences obtained from data bank of Prof. Gustavo H. Goldman, USP, Ribeirão Preto). All the primer pairs were designed to amplify 51 base pairs (Table 1). The designed primers were tested in some DNA and cDNA samples in simple PCR conditions. The reactions were carried out to a final volume of 25 $\mu$ L, containing 2 $\mu$ L of DNA or cDNA, 1X Buffer (200mM Tris-HCl pH 8,4; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> and 50mM KCl), 0,2mM dNTP and 10,0pM of each *primer*. The thermal cycling conditions were 94°C for 4 min, 40 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 2 min and a final cycle of 72°C for 5 min. The PCR products were visualized by agarose gel electrophoresis.

**Real Time PCR of cDNA from the samples at 25°C and 36°C:** all PCRs were performed by using a 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions comprised an initial step at 50°C for 2 min and 95°C for 10 minutos, and 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute, followed by dissociation step at 95°C for 15 seconds, 60°C for 20 seconds and 95°C for 15 seconds. In all experiments, appropriate negative controls containing no DNA template were subjected to the same procedure. Each reaction was analyzed at least three times. It was used the Power Sybr Green (Applied Biosystems). The results were normalized by using Ct values for the alpha and beta tubulins.

For the calculation of relative quantification of hsp70 gene, due to the increasing of temperature (25-36°C), it was applied the QR ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) [34] and R values [35]. For R calculation, it was necessary to determine the efficiency value of each primer pair. For this propose, a pool of all cDNA samples were diluted in series to 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 and 1:3125. The slopes values were took into account for efficiency calculation ( $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ ).



### **Authors' contributions**

RCT: designed and carried out all experiments and discuss the data

SMGB: participated in the virulence assay and English review of the article

SAGM: participated in the virulence assay and RNA extractions

JPAJr and JMGC: helped in the real time PCR assays, as well as the interpretation of the gene expression results.

LAT: performed all statistical tests

IGM: helped in the design and choice of experimental methodologies

EB: helped in the design and choice of experimental methodologies, and organizing data and writing.

### **List of abbreviations**

EDTA: EthyleneDiamineTetrAcetic acid

KCl: Potassium Clorete

Tris HCl: Tris-Hydrochloride

MgCl<sub>2</sub>: Magnesium Clorete

DNTP: Desoxirribonucleotides Tri Phosphate

BSA: Bovine Serum Albumine

DEPC: Diethyl Pyrocarbonate

DTT: Dithiothreitol

## **Figures Legends**

Figure 1: Boxplot of area ( $\mu\text{m}^2$ ) x isolate.

Figure 2: Isolates at 36°C (1000X).

Figure 3: Conidia production at 30°C. Arthro-aleuro-conidia (A), Planoconidia (B) and Arthroconidia (C).

Figure 4: Presence of chlamidoconidia during the M-Y transition.

Figure 5: Boxplot of time for occurrence of M-Y transition in days X isolate.

Figure 6: Viability of cells as function of temperature

Figure 7: Estimate of CFU/g in testis (A), spleen (B) and liver (C) after 30 and 60 days of inoculation with the isolates T4, T10, T13, PB265, BT84, BT85 E Pbcão.

Figure 8: propose dendogram for the virulence character.

Figure 9: PCR of hsp70 gene. Lane 1: 1Kb ladder (Promega), lanes 2-10: PCR of isolates T4, T10, T13, S1, Bt84, Bt85, Pb265, D01 e Pbcão respectively, lane 11: negative control.

Figure 10: RFLP of the amplicom from PCR of hsp70 gene with the enzymes Nci (A), Sty (B), HaeII (C) and RsaI (D). In all digestions, the sequence of samples was: Lane1: 1Kb Ladder (Promega), lanes 2-10: isolates T4, T10, T13, S1, Bt84, Bt85, Pb265, D01, Pbcão, lane 11: pet28a vector (control for digestion).

Figure 11: Neighbour Joining tree.

Figure 12: PCRs of DNA and cDNA with the designed primers for Real Time PCR.

Lanes 1-4: PCR with HSP70fwd/HSP70rev primers, lanes 5-8: PCR with Betafwd/Betarev primers, lanes 9-12: PCR with Alfafwd/Alfarev primers,

lane 13: 1Kb ladder (Promega). The sample sequence for the three PCRs is: negative control, S1 DNA, T4 cDNA and S1 cDNA.

Figure 13: Increase of hsp70 expression for each isolate, after the increase of temperature, from 25 to 36°C for 5h. QR values, on Y axis, present how many times more the gene was expressed due to temperature changing).

### Acknowledgments

We thank Dr. Everaldo dos Reis Marques, Dr. Silvana Petrofeza da Silva, Dr. Gustavo Henrique Goldman and Dr. Célia Maria de Almeida Soares, for supplying gene and primers sequences and for the important suggestions. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp Grant number: 04/12949-6).

### References:

1. Franco M: **Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis.** *J Med Vet Mycol* 1987, **25**:5-18.
2. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. **Paracoccidioidomycose** In *Micologia médica*. 7th edition. Edited by Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. São Paulo: Sarvie; 1984: 189-216.
3. Bagagli E, Franco M, Bosco SMG, Hebel-Barbosa F, Trinca LA, Montenegro MR. **High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillo (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study.** *Med Mycol* 2003, **41**:217-223.

4. Farias MR, Werner J, Muro MD, Marques SA, Marques MEA, Franco MF, Ribeiro MG, Custodio CC, Condas LAZ, Bosco SMG, Bagagli E. **Canine paracoccidioidomycosis: case report of generalized lymphadenitis.** *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2005, **47(14)**:64.
5. Bosco SMG, Theodoro RC, Macoris SAG, Farias MR, Muro M, Ribeiro MG, Bagagli E. **Morphological and molecular characterization of the first isolate of *Paracoccidioides brasiliensis* from dog (*Canis familiars*).** *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2005, **47(14)**:62-63.
6. Macoris SAG, Sugizaki MF, Peraçoli MTS, Bosco SMG, Hebler-Barbosa F, Simões LB, Theodoro RC, Trinca LA, Bagagli E. **Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos and patients.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006, **10(3)**:331-334.
7. Theodoro, R.C., Bosco, S.M.G., Sugizaki, M.F.; Bagagli, E. **Variation on mycelial-to-yeast phase transition and production of conidia in different isolates of *Paracoccidioides brasiliensis* obtained from human, armadillo and dog.** *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2005, **47(14)**:45.
8. Mendes RP: **The gamut of clinical manifestations.** In *Paracoccidioidomycosis* 1th edition Edited by Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. Boca Raton: CRC press; 1994: 233-257.
9. Matute DR, McEween JG, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT, Restrepo A, Morais F, Nino-Veja G, Taylor JW. **Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies.** *Mol Biol Evol* 2006, **23**:65-73.
10. Koufopanou V, Burt A, Szaro T, Taylor J.W. **Gene genealogies, cryptic species, and molecular evolution in the human pathogen *Coccidioides***

- immitis* and relatives (Ascomycota, Onygenales). *Mol Biol Evol* 2001, **18**:1246-1258.
11. Kasuga T, White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castañeda E, Lacaz CS, Heins-Vaccari, EM, Freitas RS, Zancopé-Oliveira RM, Qin Z, Negroni R, Carter DA, Mikami Y, Tamura M, Taylor ML, Miller GF, Poonwan N, Taylor JW. **Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum***. *Mol Ecol* 2003, **12**:3383-3401.
  12. Cooper GM: *A célula: Uma Abordagem Molecular*. Porto Alegre:Artmed; 1991.
  13. Goldman GH, Dos Reis Marques E, Duarte Ribeiro DC, De Souza Bernardes LA, Quiapin AC, Vitorelli PM, Savoldi M, Semighini CP, De Oliveira RC, Nunes LR, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Ferreira LE, Moreira JC, Bogossian AP, Tekaia F, Nobrega MP, Nobrega FG, Goldman MH. **Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes**. *Euk Cell* 2003, **2**(1):34-48.
  14. Marques ER, Ferreira MES, Drummond RD, Felix JM, Menossi M, Savoldi M, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Carvalho KC, Goldman MHS, Goldman GH. **Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis**. *Mol Gen Genom* 2004, **271**:667-677.
  15. Da Silva SP, Borges-Walmsley MI, Pereira Soares CMA, Walmsley AR, Felipe MSS. **Differential expresión of an hsp70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis***. *Mol. Microbiol* 1999, **31**(4):1039-1050.

16. Burnie JP, Carter TL, Hodgetts SJ, Matthews RC. **Fungal heat-shock proteins in human disease.** *FEMS Microbiol Rev* 2006, **30**:53-88.
17. Bisio LC, SILVA SP, Silva-Pereira I, Xavier MAS, Puccia R, Venâncio EJ, Soares CMA, Felipe MSS. **A new member of *Paracoccidioides brasiliensis* 70 kDa heat shock protein family reacts with paracoccidioidomycosis patient sera.** *Med Mycol* 2005, **43**:1-9.
18. Kurokama CS, Sugizaki MF, Perçoli MTS. **Virulence Factors in fungi of systemic mycoses.** *Rev Inst Med Trop* 1998, **40(3)**:125-135.
19. Ledberg J. **Paradoxes of the Host-Parasite Relationship.** *ASM News* 1999, **65**:811-816.
20. Casadevall A, Steenbergen JN, Nosanchuk JD. **“Ready – made” virulence and “dual use” virulence factors in pathogenic environmental fungi – The *Cryptococcus neoformans* paradigm.** *Curr Opin Microbiol* 2003, **6**:332-337.
21. Steenbergen JN, Casadevall A. **The origin and maintenance of virulence for the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*.** *Microb and Infect* 2003, **5**:667-675.
22. Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Malliaris SD, Casadevall A. **Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *istoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*.** *Infect and Immun* 2004, **72**:3478-3488.
23. Bustamante –Simon B, McEwen JG, Tabares AM, Arango M, Restrepo-Moreno A. **Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*.** *J Med Vet Mycol* 1985, **23**:407-414.
24. Terçarioli GR, Theodoro RC, Bosco SMG, Reis GM, Macoris SAG, Simões LB, Bagagli E. **Ecological study of *Paracoccidides brasiliensis* in soil: culture and molecular detection.** *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2005, **47(14)**:63.

25. Salazar ME, Restrepo A. **Morphogenesis of the mycelium to yeast transformation in *Paracoccidioides brasiliensis***. *Sabouradia* 1984, **22**:7-11.
26. San Blas F, San Blas G: **Bioquímica y dimorfismo en *P. brasiliensis***. In *Paracoccidioidomycosis*. 1th edition. Edited by. Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo AM. São Paulo: Sarvier; 1982:35-38.
27. Florez AM, Oviedo A, Cardona A, Herrera M, Garcia E, Restrepo A, McEwen JG. **Molecular cloning and characterization of two hsp 70 homologous genes from the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis***. *Biomed* 2003, **23**:424-436.
28. Ridley M: *Evolução*. Porto Alegre: Artmed; 2006.
29. Teixeira MM, De Carvalho MJA, Dantas AS, Felipe MSS. **The hsp70 gene presents sequence differences among isolates of *Paracoccidioides brasiliensis***. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2005, **47(14)**:48.
30. Hebel-Barbosa F, Morais FV, Montenegro MR, Kuramae EE, Taylor JW, Montes B, McEwen JG, Puccia R, Bagagli E. **Sequence comparison of the internal transcribed spacer regions and gp 43 in *Paracoccidioides brasiliensis* for patients and armadillos *Dasypus novemcinctus***. *J Clin Microbiol* 2003, **41**:5735-5737.
31. Caruso M, Sacco M, Medoff G, Maresca B. **Heat shock 70 gene is differentially expressed in *Histoplasma capsulatum* strains with different levels of thermotolerance and pathogenicity**. *Mol Microbiol* 1987, **1(2)**:151-158.
32. Singer-Vermes LM, Burger E, Calich VLG, Modesto-Xavier LH, Sakamoto TN, Sugizaki MF, Meira DA, Mendes R.P. **Pathogenicity and immunogenicity of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in the human**

- disease and in an experimental murine model. *Clin Exp Immunol* 1994, **97**:113-119.
33. McCullough MJ, Disalvo AF, Clemons KV, Park P, Stevens DA. **Molecular epidemiology of *Blastomyces dermatitidis***. *Clin Infec Dis* 2000, **30**:328-335.
34. Livak KJ, Schmittgen TD. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{\Delta\Delta C(T)}$  method**. *Methods* 2001, **25**:402-408.
35. Pfaffl, MW. **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR**. *Nucl Ac Res* 2001, **29**:2002-2007.



## Tables

**Table 1:** primers designed for Real Time PCR.

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	Amplicom for DNA	Amplicom for cDNA
Alfa tubulina	Alfafwd	CCCAGCTTGGAACAGTGCT	NK	51pb
	Alfarev	TCAAACCGTGCTCGAGGAG		
Beta tubulina	Betafwd	CTCGTCCATTCCCTCACCC	NK	51pb
	Betarev	TTCCGACGCAAGGCTTTC		
Hsp70	Hsp70-fwd	TTTAATACTTCAAATGGCTCCAGC	164pb	51pb
	Hsp70-rev	ACGTGGTCCCGAGATCGAT		

NK: not know, since the sequences used for primer designed were from cDNA.

**Table 2:** Evaluation of microscopic M-Y transition.

Isolado	30°C	32°C	34°C	36°C
<b>T4B17</b>	M/Y	Y	Y	Y
<b>T10B1</b>	M	M	Y	Y
<b>T13YN2</b>	M	M/Y	Y	Y
<b>Pb-S1baço</b>	M	Y	Y	Y
<b>Bt84</b>	M	M	M/Y	Y
<b>Bt85</b>	M	M/Y	Y	Y
<b>Pb265</b>	M	M/Y	Y	Y
<b>D01</b>	M	M/Y	Y	Y
<b>Pb - cão</b>	M/Y	M/Y	Y	Y

M= mycelia phase

M/Y= presence of yeast cell with no buddings and yeast cells in the middle of hyphae. Y= yeast cells with buddings, completed M-Y transition.

**Table 3:** Tukey Test for the analysis of virulence profiles (averages with the same letter are not significantly different).

Organ/days	Averages of log CFU/g							
Testis 30d	BT85 1,82 <sup>A</sup>	Pb265 2,55 <sup>AB</sup>	BT84 2,61 <sup>AB</sup>	T4 3,21 <sup>ABC</sup>	S1 3,64 <sup>ABC</sup>	Pbcão 3,78 <sup>BC</sup>	T13 4,58 <sup>C</sup>	T10 4,60 <sup>C</sup>
Testis 60d	BT85 1,80 <sup>A</sup>	T4 2,25 <sup>AB</sup>	BT84 2,39 <sup>AB</sup>	Pbcão 2,49 <sup>AB</sup>	Pb265 2,55 <sup>AB</sup>	T13 3,42 <sup>AB</sup>	S1 3,93 <sup>B</sup>	T10 3,39 <sup>*</sup>
Spleen 30d	BT85 2,52 <sup>A</sup>	T4 2,54 <sup>A</sup>	BT84 2,54 <sup>A</sup>	Pb265 2,76 <sup>AB</sup>	Pbcão 3,34 <sup>AB</sup>	S1 3,63 <sup>BC</sup>	T13 4,41 <sup>C</sup>	T10 5,80 <sup>D</sup>
Spleen 60d	BT85 2,52 <sup>A</sup>	BT84 2,54 <sup>A</sup>	Pb265 2,59 <sup>A</sup>	Pbcão 2,89 <sup>A</sup>	T4 3,12 <sup>AB</sup>	T13 4,11 <sup>BC</sup>	S1 4,16 <sup>C</sup>	T10 4,29 <sup>*</sup>
Liver 30d	BT85 1,55 <sup>A</sup>	Pb265 1,60 <sup>AB</sup>	BT84 2,00 <sup>ABC</sup>	T4 2,71 <sup>BCD</sup>	S1 2,94 <sup>CD</sup>	Pbcão 3,01 <sup>CD</sup>	T13 3,83 <sup>D</sup>	T10 5,21 <sup>E</sup>
Liver 60d	BT85 1,55 <sup>A</sup>	Pbcão 1,57 <sup>A</sup>	Pb265 1,60 <sup>A</sup>	BT84 2,00 <sup>A</sup>	T4 2,72 <sup>AB</sup>	S1 3,72 <sup>BC</sup>	T13 4,22 <sup>C</sup>	T10 4,97 <sup>*</sup>

\*:Tukey Test was not performed for T10 (60d), since only one, of the five hamsters, survived at this period. The isolate D01 was not evaluated. The high virulence isolates are marked in blue, while the low-intermediary virulence ones in black.

**Table 4:** polymorphic sites found among the 1022 nucleotides sequenced for the 9 isolates.

The bases in capital letters are the informative polymorphisms.

Site*	Nucleic acids								
	T4	T10	T13	S1	BT84	BT85	PB265	D01	PB-Cão
399 (I1)	A	G	A	A	G	A	A	A	G
593 (E2)	c	c	c	c	c	c	c	-	c
756 (E2)	-	-	-	-	-	-	-	-	c
819 (E2)	c	c	c	c	c	c	-	c	c
828 (E2)	C	T	C	C	T	C	C	C	T
1920(E2)	a	a	a	a	a	a	a	t	a
1948 (E2)	C	C	C	G	C	C	C	C	G
1950 (E2)	c	t	c	c	c	c	c	c	c
1989 (E2)	g	g	g	g	g	g	g	t	g
2262 (I2)	C	T	C	C	T	C	C	C	T
2276 (I2)	A	-	A	A	-	A	A	-	-
2344 (E3)	G	G	-	G	-	G	G	G	G
2374 (E3)	g	g	g	g	g	g	-	g	g

\*Sites correspond to the sequence deposited by Da Silva et al [15] [GenBank: U91560].

I1: intron 1, I2: intron 2, E2: exon 2, E3: exon 3.

# Figures

Figure 1

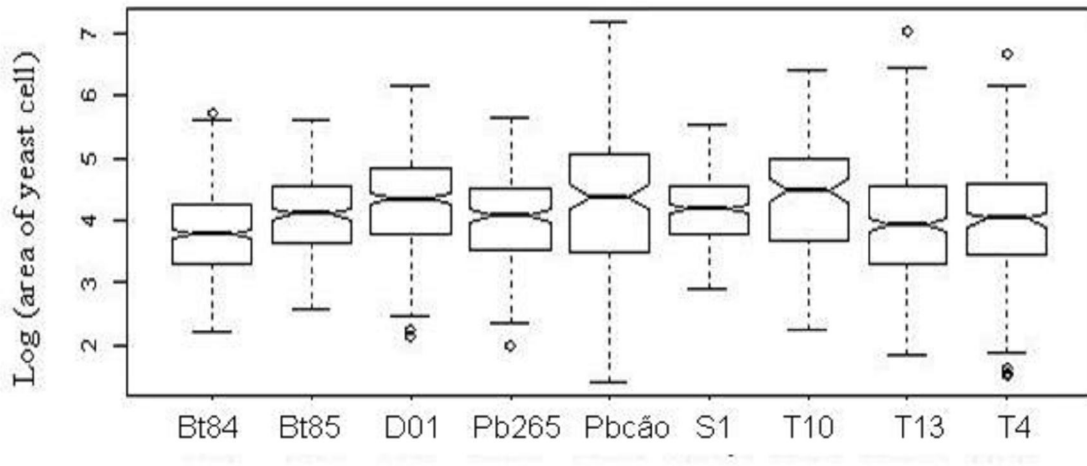


Figure 2

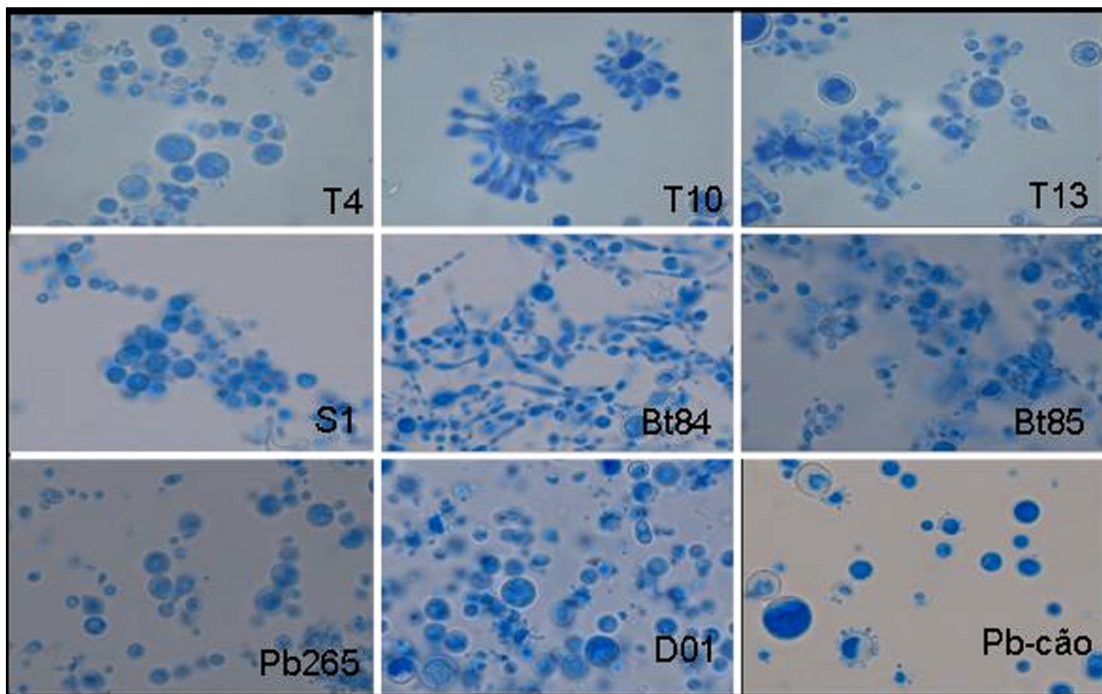
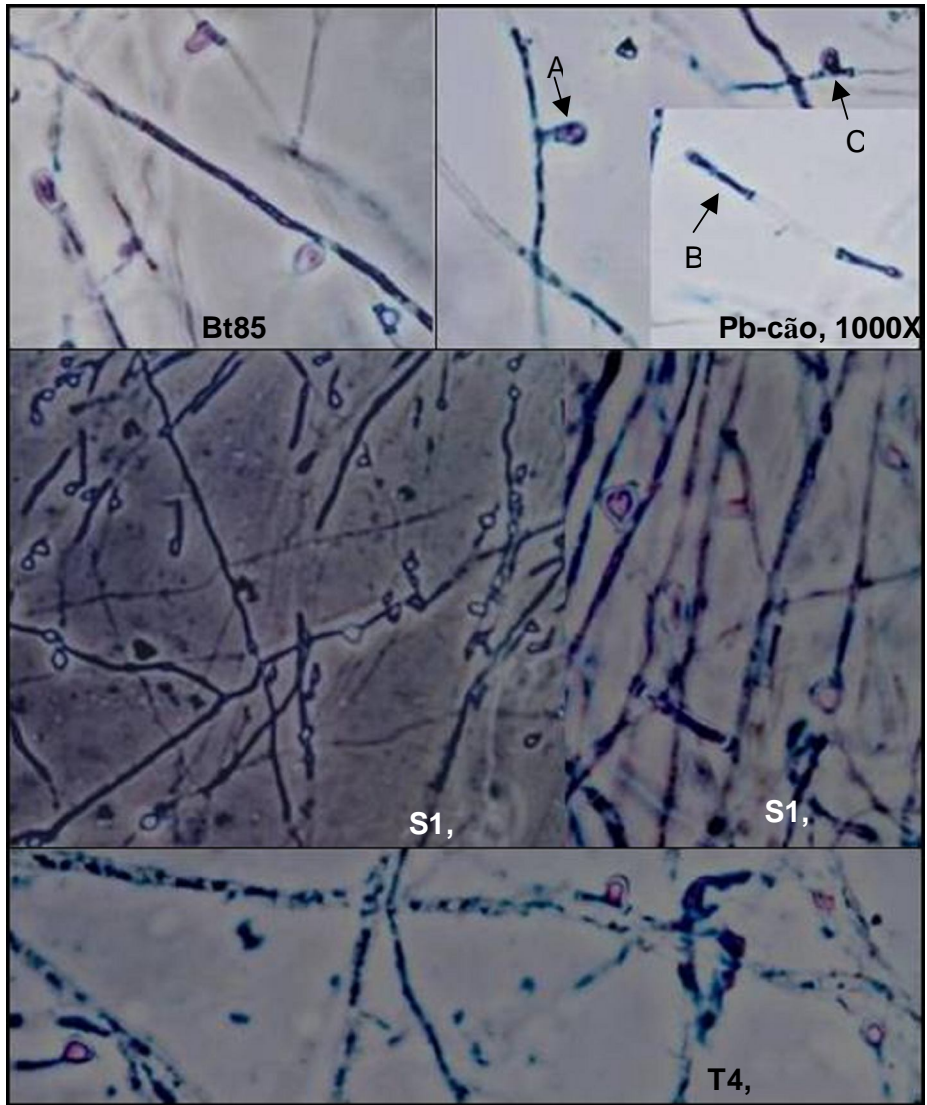
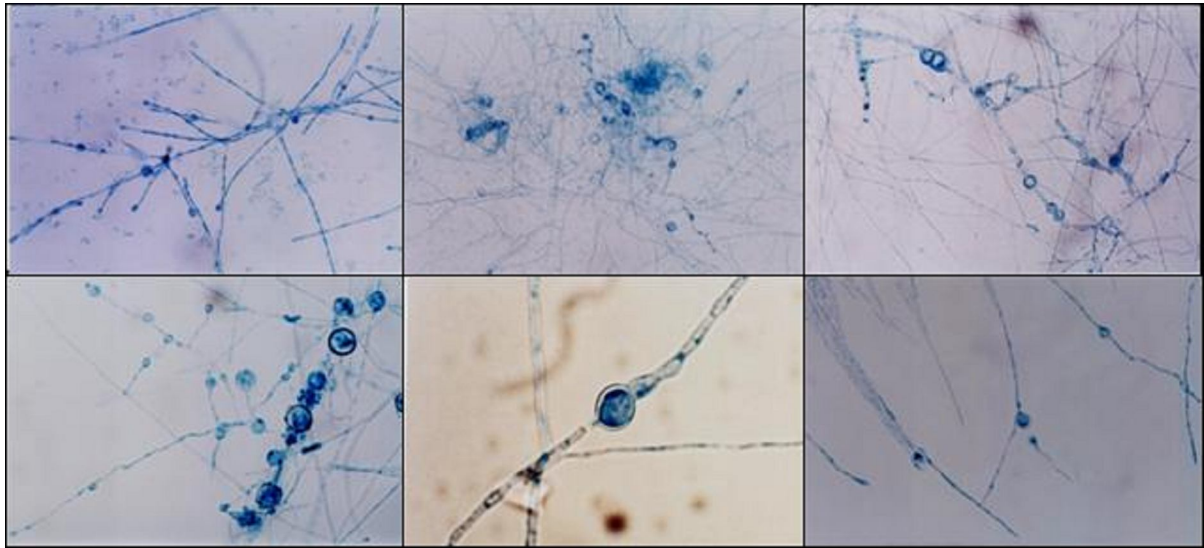


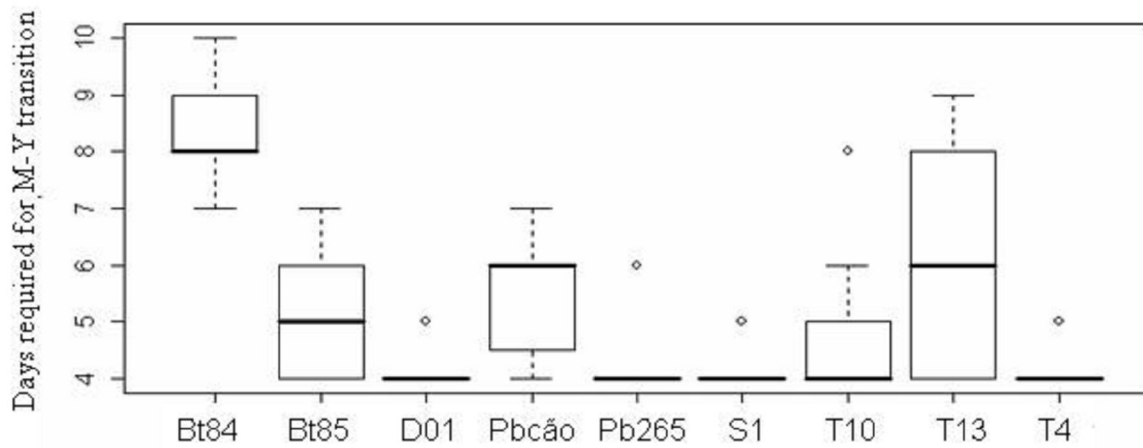
Figure 3



**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**

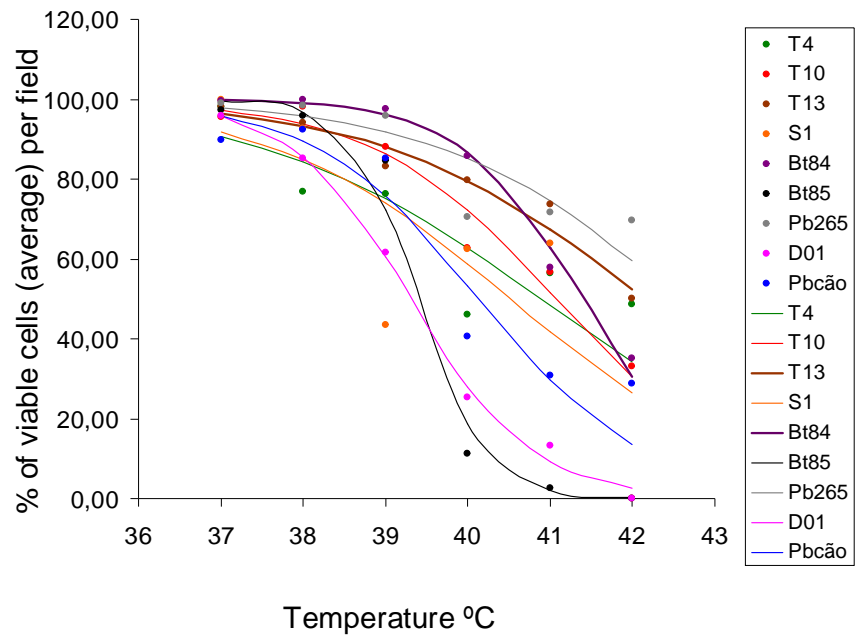
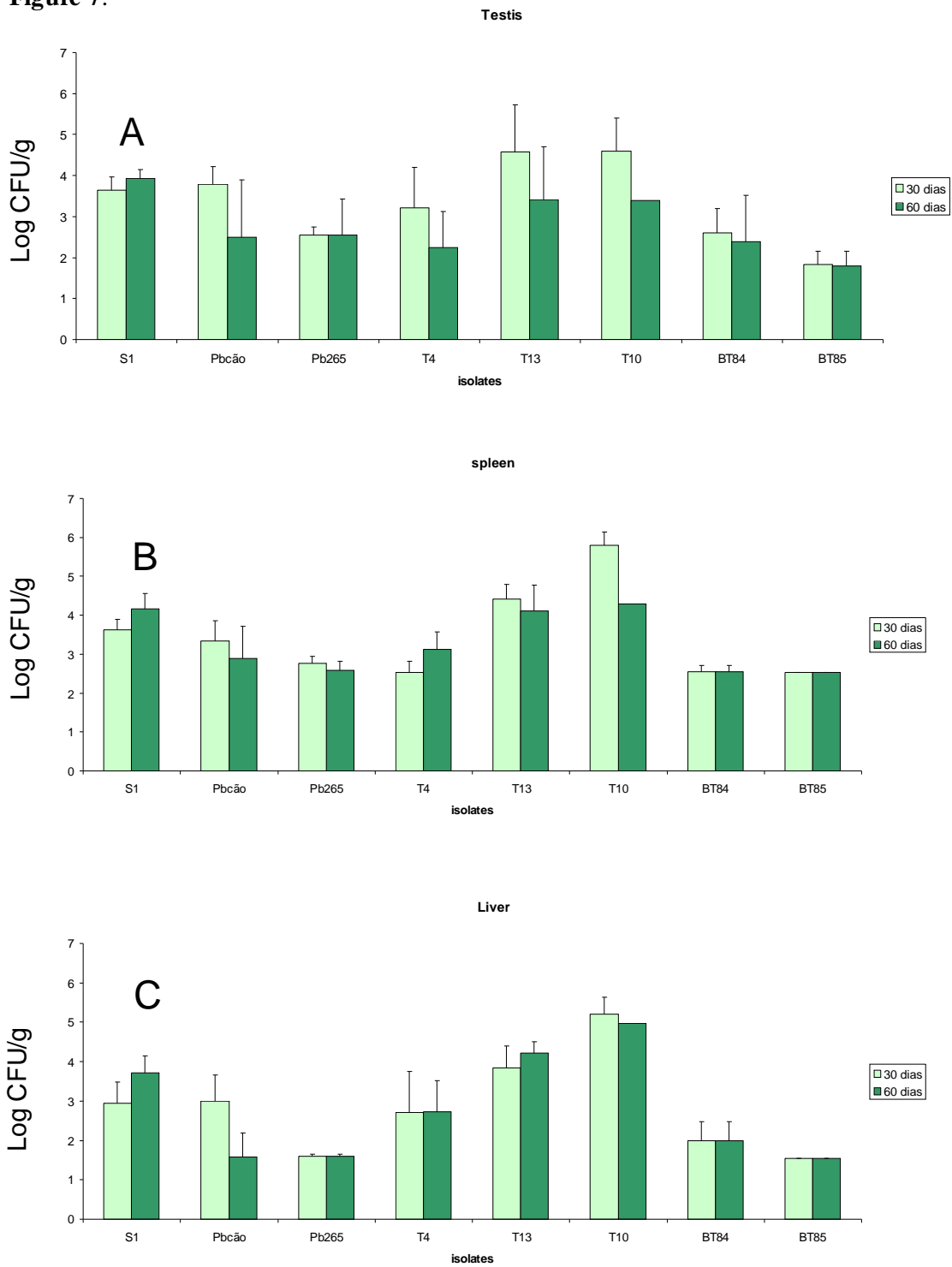
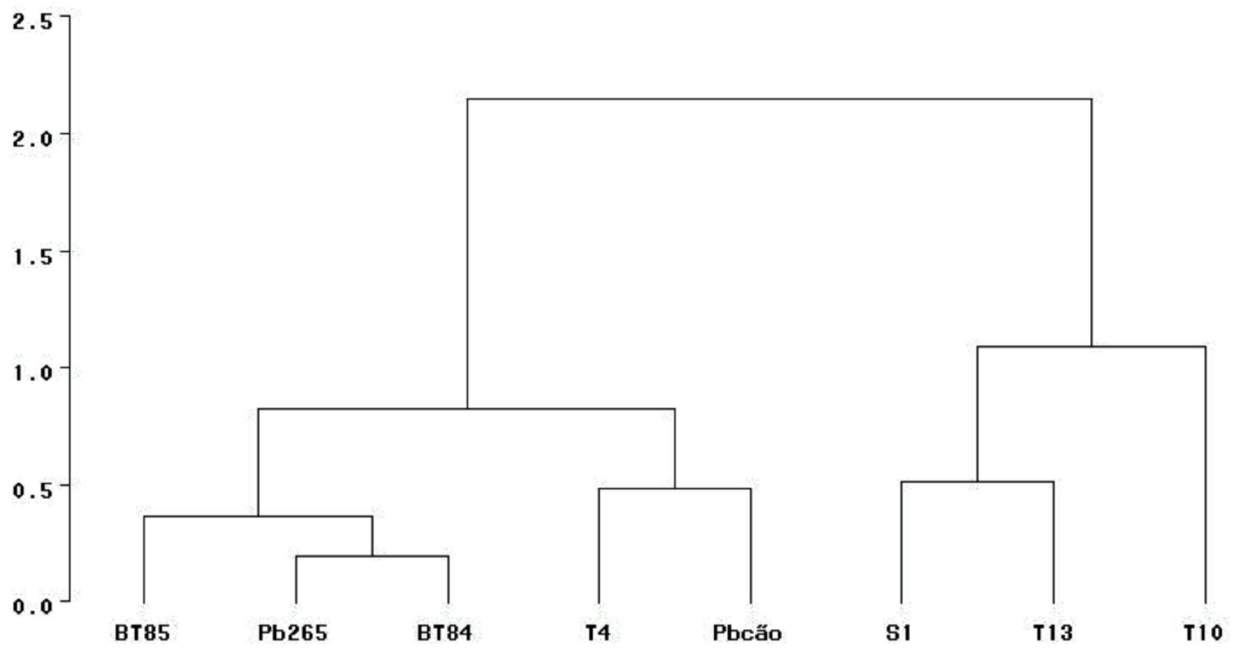


Figure 7.

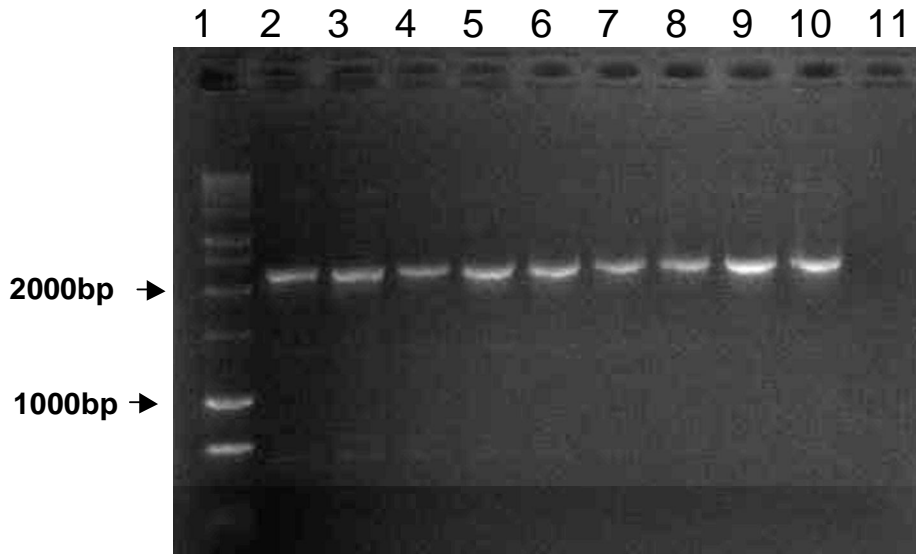


**Figure 8**





**Figure 9**



**Figure 10**

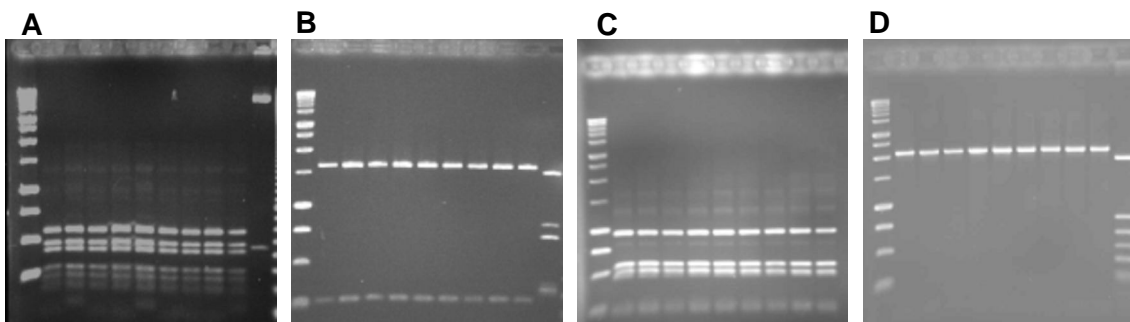
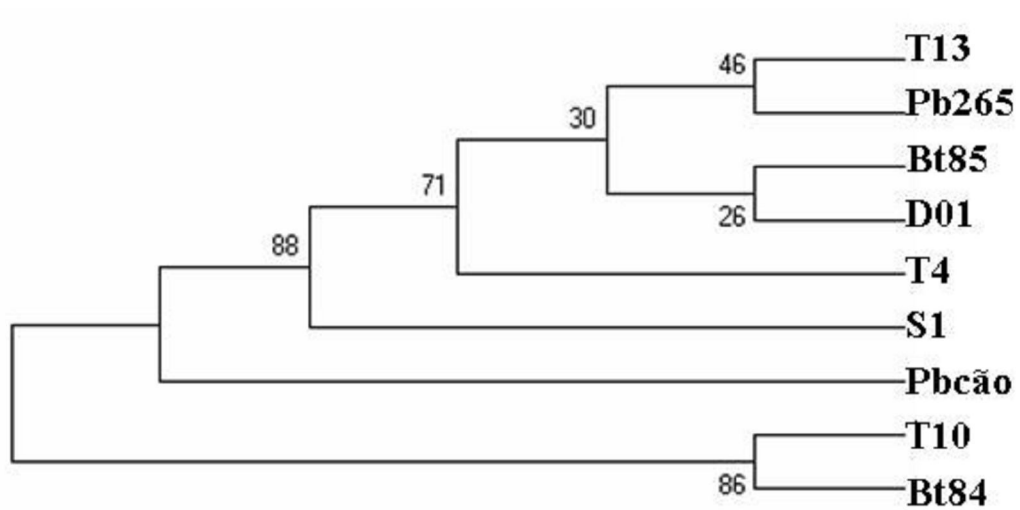
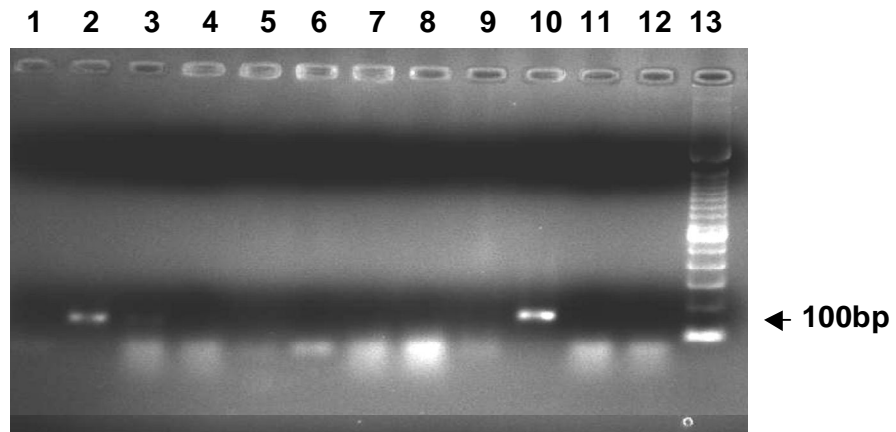


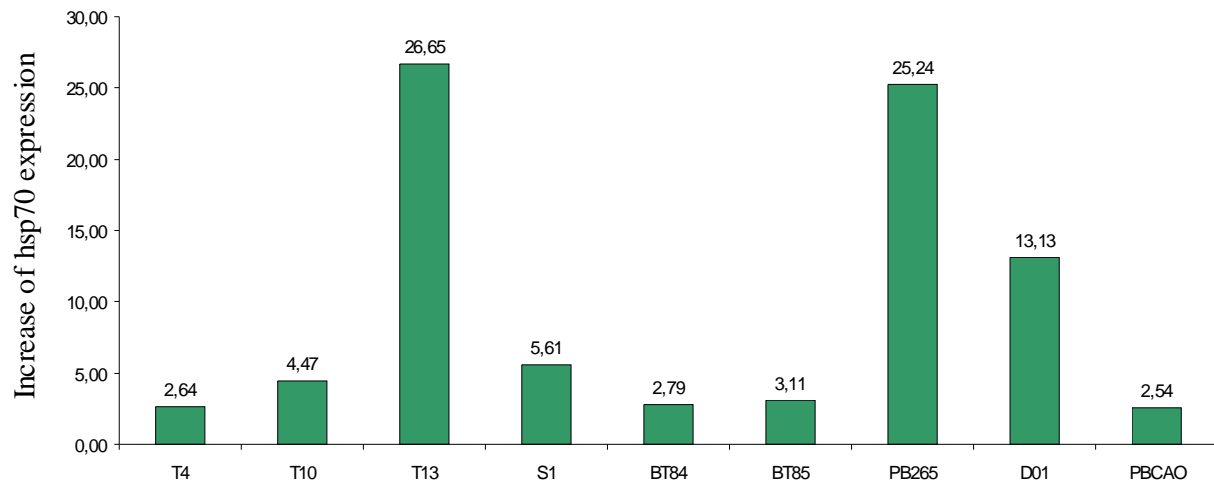
Figure 11



**Figure 12**

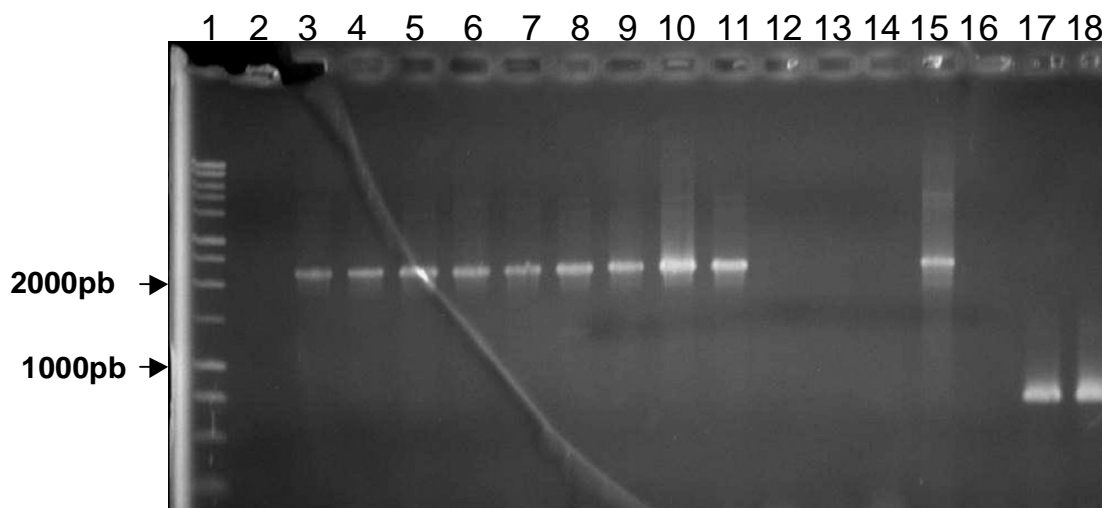


**Figure 13**



## V Anexos: figuras não incluídas no artigo.

### V.1 PCR do gene *hsp70* e dos introns 1 e 2



Linha 1: marcador de 1Kb (Promega), linha 2: controle negativo; linhas 3-11: PCR do *hsp70* dos isolados T4B17, T10B1, T13LN2, S1baço, Bt84, Bt85, Pb265, D01 e Pbcão respectivamente, linha 12: controle negativo; linhas 13 e 14: PCR do intron 1 dos isolados Bt84 e Pbcão; linha 15: Nested PCR para amplificação do intron 1 do Pb265 (produto resultante da primeira PCR); linha 16: controle negativo, linhas 17 e 18: PCR do intron 2 dos isolados Bt84 e Pbcão (produto em torno de 680pb).





	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *																											
T4B17	T	T	T	G	A	C	G	C	C	A	A	G	C	G	T	C	T	C	A	T	T	G	G	C	C	G	C	A	A	A	T	T	C	G	C	C	G	A	T	C	C	T	G	A	G	G	T
T10B1	T	T	T	G	A	C	G	C	C	A	A	G	C	G	T	C	T	C	A	T	T	G	G	C	C	G	C	A	A	A	T	T	C	G	C	C	G	A	T	C	C	T	G	A	G	G	T
T13LN2	T	T	T	G	A	C	G	C	C	A	A	G	C	G	T	C	T	C	A	T	T	G	G	C	C	G	C	A	A	A	T	T	C	G	C	C	G	A	T	C	C	T	G	A	G	G	T
S1bao	T	T	T	G	A	C	G	C	C	A	A	G	C	G	T	C	T	C	A	T	T	G	G	C	C	G	C	A	A	A	T	T	C	G	C	C	G	A	T	C	C	T	G	A	G	G	T
Bt84	T	T	T	G	A	C	G	C	C	A	A	G	C	G	T	C	T	C	A	T	T	G	G	C	C	G	C	A	A	A	T	T	C	G	C	C	G	A	T	C	C	T	G	A	G	G	T
Bt85	T	T	T	G	A	C	G	C	C	A	A	G	C	G	T	C	T	C	A	T	T	G	G	C	C	G	C	A	A	A	T	T	C	G	C	C	G	A	T	C	C	T	G	A	G	G	T
Pb265	T	T	T	G	A	C	G	C	C	A	A	G	C	G	T	C	T	C	A	T	T	G	G	C	C	G	C	A	A	A	T	T	C	G	C	C	G	A	T	C	C	T	G	A	G	G	T
D01	T	T	T	G	A	C	G	C	C	A	A	G	C	G	T	C	T	C	A	T	T	G	G	C	C	G	C	A	A	A	T	T	C	G	C	C	G	A	T	C	C	T	G	A	G	G	T
Pbcao	T	T	T	G	A	C	G	C	C	A	A	G	C	G	T	C	T	C	A	T	T	G	G	C	C	G	C	A	A	A	T	T	C	G	C	C	G	A	T	C	C	T	G	A	G	G	T
PbU91560	T	T	T	G	A	A	G	C	A	A	A	A	G	G	C	T	C	A	T	C	G	G	T	C	G	C	A	A	A	T	T	C	G	C	G	G	A	C	C	C	G	A	A	G	T		

	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *																										
T4B17	C	C	A	A	T	C	C	G	A	C	A	T	G	A	A	G	C	A	C	T	T	C	C	C	T	T	C	A	A	G	G	T	C	A	T	T	G	A	C	A	A	G	G	C	G	G
T10B1	C	C	A	A	T	C	C	G	A	C	A	T	G	A	A	G	C	A	C	T	T	C	C	C	T	T	C	A	A	G	G	T	C	A	T	T	G	A	C	A	A	G	G	C	G	G
T13LN2	C	C	A	A	T	C	C	G	A	C	A	T	G	A	A	G	C	A	C	T	T	C	C	C	T	T	C	A	A	G	G	T	C	A	T	T	G	A	C	A	A	G	G	C	G	G
S1bao	C	C	A	A	T	C	C	G	A	C	A	T	G	A	A	G	C	A	C	T	T	C	C	C	T	T	C	A	A	G	G	T	C	A	T	T	G	A	C	A	A	G	G	C	G	G
Bt84	C	C	A	A	T	C	C	G	A	C	A	T	G	A	A	G	C	A	C	T	T	C	C	C	T	T	C	A	A	G	G	T	C	A	T	T	G	A	C	A	A	G	G	C	G	G
Bt85	C	C	A	A	T	C	C	G	A	C	A	T	G	A	A	G	C	A	C	T	T	C	C	C	T	T	C	A	A	G	G	T	C	A	T	T	G	A	C	A	A	G	G	C	G	G
Pb265	C	C	A	A	T	C	C	G	A	C	A	T	G	A	A	G	C	A	C	T	T	C	C	C	T	T	C	A	A	G	G	T	C	A	T	T	G	A	C	A	A	G	G	C	G	G
D01	C	C	A	A	T	C	C	G	A	C	A	T	G	A	A	G	C	A	C	T	T	C	C	C	T	T	C	A	A	G	G	T	C	A	T	T	G	A	C	A	A	G	G	C	G	G
Pbcao	C	C	A	A	T	C	C	G	A	C	A	T	G	A	A	G	C	A	C	T	T	C	C	C	T	T	C	A	A	G	G	T	C	A	T	T	G	A	C	A	A	G	G	C	G	G
PbU91560	G	C	A	G	G	C	C	G	A	C	A	T	G	A	A	A	C	A	T	T	T	T	C	C	T	T	T	A	A	A	T	C	A	C	G	G	A	T	A	A	G	G	G	G	G	

	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *																										
T4B17	G	A	A	A	G	C	C	A	G	T	C	A	T	C	T	C	C	G	T	T	G	A	G	T	T	C	A	A	G	G	G	C	G	A	-	G	A	G	A	G	C	A	G	T	T	
T10B1	G	A	A	A	G	C	C	A	G	T	C	A	T	C	T	C	C	G	T	T	G	A	G	T	T	C	A	A	G	G	G	C	G	A	-	G	A	G	A	G	C	A	G	T	T	
T13LN2	G	A	A	A	G	C	C	A	G	T	C	A	T	C	T	C	C	G	T	T	G	A	G	T	T	C	A	A	G	G	G	C	G	A	-	G	A	G	A	G	C	A	G	T	T	
S1bao	G	A	A	A	G	C	C	A	G	T	C	A	T	C	T	C	C	G	T	T	G	A	G	T	T	C	A	A	G	G	G	C	G	A	-	G	A	G	A	G	C	A	G	T	T	
Bt84	G	A	A	A	G	C	C	A	G	T	C	A	T	C	T	C	C	G	T	T	G	A	G	T	T	C	A	A	G	G	G	C	G	A	-	G	A	G	A	G	C	A	G	T	T	
Bt85	G	A	A	A	G	C	C	A	G	T	C	A	T	C	T	C	C	G	T	T	G	A	G	T	T	C	A	A	G	G	G	C	G	A	-	G	A	G	A	G	C	A	G	T	T	
Pb265	G	A	A	A	G	C	C	A	G	T	C	A	T	C	T	C	C	G	T	T	G	A	G	T	T	C	A	A	G	G	G	C	G	A	-	G	A	G	A	G	C	A	G	T	T	
D01	G	A	A	A	G	C	C	A	G	T	C	A	T	C	T	C	C	G	T	T	G	A	G	T	T	C	A	A	G	G	G	C	G	A	-	G	A	G	A	G	C	A	G	T	T	
Pbcao	G	A	A	A	G	C	C	A	G	T	C	A	T	C	T	C	C	G	T	T	G	A	G	T	T	C	A	A	G	G	G	C	G	A	-	C	G	A	G	A	G	C	A	G	T	T
PbU91560	G	G	A	A	C	C	C	A	A	G	A	T	T	C	A	G	G	T	T	G	G	A	G	T	T	C	A	G	G	G	G	G	A	-	G	G	A	A	G	C	A	T	T	T		

	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *																							
T4B17	C	A	C	C	C	C	G	G	A	G	G	A	A	T	C	T	C	C	A	T	G	G	T	C	C	T	G	A	C	G	A	A	G	A	T	G	A	G	A	G	A	A	A
T10B1	C	A	C	C	C	C	G	G	A	G	G	A	A	T	C	T	C	C	A	T	G	G	T	C	C	T	G	A	C	G	A	A	G	A	T	G	A	G	A	G	A	A	A
T13LN2	C	A	C	C	C	C	G	G	A	G	G	A	A	T	C	T	C	C	A	T	G	G	T	C	C	T	G	A	C	G	A	A	G	A	T	G	A	G	A	G	A	A	A
S1bao	C	A	C	C	C	C	G	G	A	G	G	A	A	T	C	T	C	C	A	T	G	G	T	C	C	T	G	A	C	G	A	A	G	A	T	G	A	G	A	G	A	A	A
Bt84	C	A	C	C	C	C	G	G	A	G	G	A	A	T	C	T	C	C	A	T	G	G	T	C	C	T	G	A	C	G	A	A	G	A	T	G	A	G	A	G	A	A	A
Bt85	C	A	C	C	C	C	G	G	A	G	G	A	A	T	C	T	C	C	A	T	G	G	T	C	C	T	G	A	C	G	A	A	G	A	T	G	A	G	A	G	A	A	A
Pb265	C	A	C	C	C	C	G	G	A	G	G	A	A	T	C	T	C	C	A	T	G	G	T	C	C	T	G	A	C	G	A	A	G	A	T	G	A	G	A	G	A	A	A
D01	C	A	C	C	C	C	G	G	A	G	G	A	A	T	C	T	C	C	A	T	G	G	T	C	C	T	G	A	C	G	A	A	G	A	T	G	A	G	A	G	A	A	A
Pbcao	C	A	C	C	C	C	G	G	A	G	G	A	A	T	C	T	C	C	A	T	G	G	T	C	C	T	G	A	C	G	A	A	G	A	T	G	A	G	A	G	A	A	A
PbU91560	C	A	C	C	C	C	G	A	A	G	A	A	T	T	C	T	C	C	A	T	G	T	T	C	C	G	G	A	G	A	A	G	A	A	G	A	G	A	G	A	A	A	A

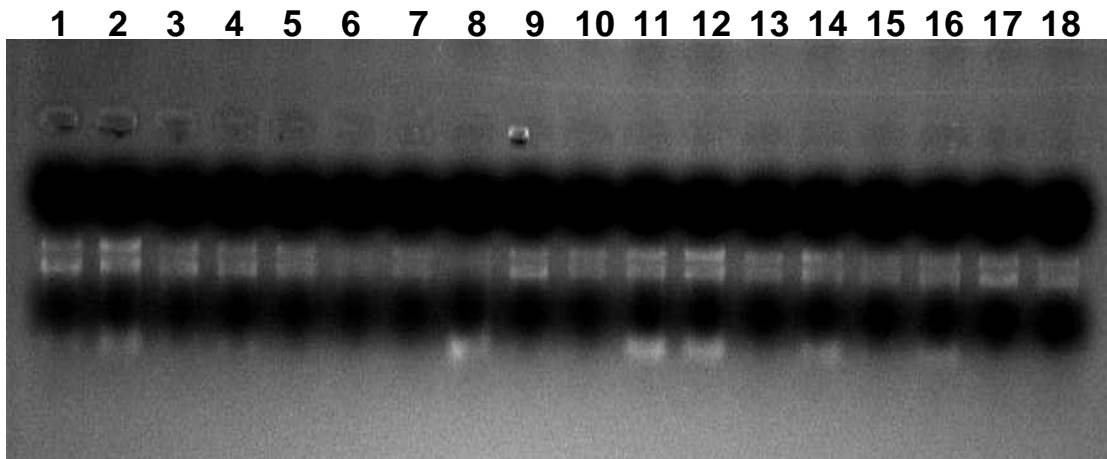








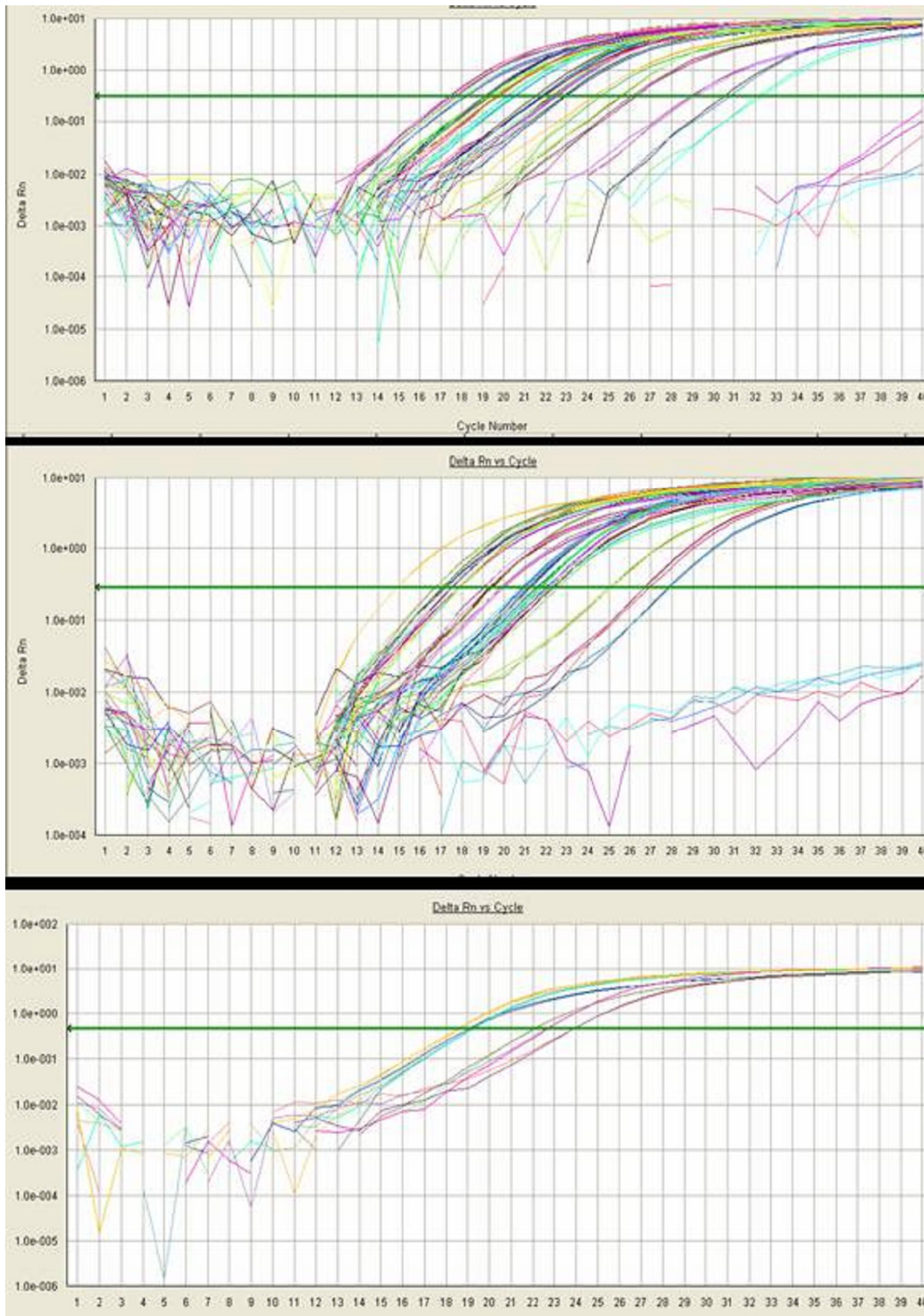
### V.3 Extração de RNA total



Amostras: isolados na fase micelial (linhas 1-9) e após 5h a 36°C (linhas 10-18). A ordem das amostras miceliais e a 36°C é: T4B17, T10B1, T13LN2, S1baço, Bt84, Bt85, Pb265, D01 e Pbcão. As bandas visíveis correspondem ao RNA ribossomal.

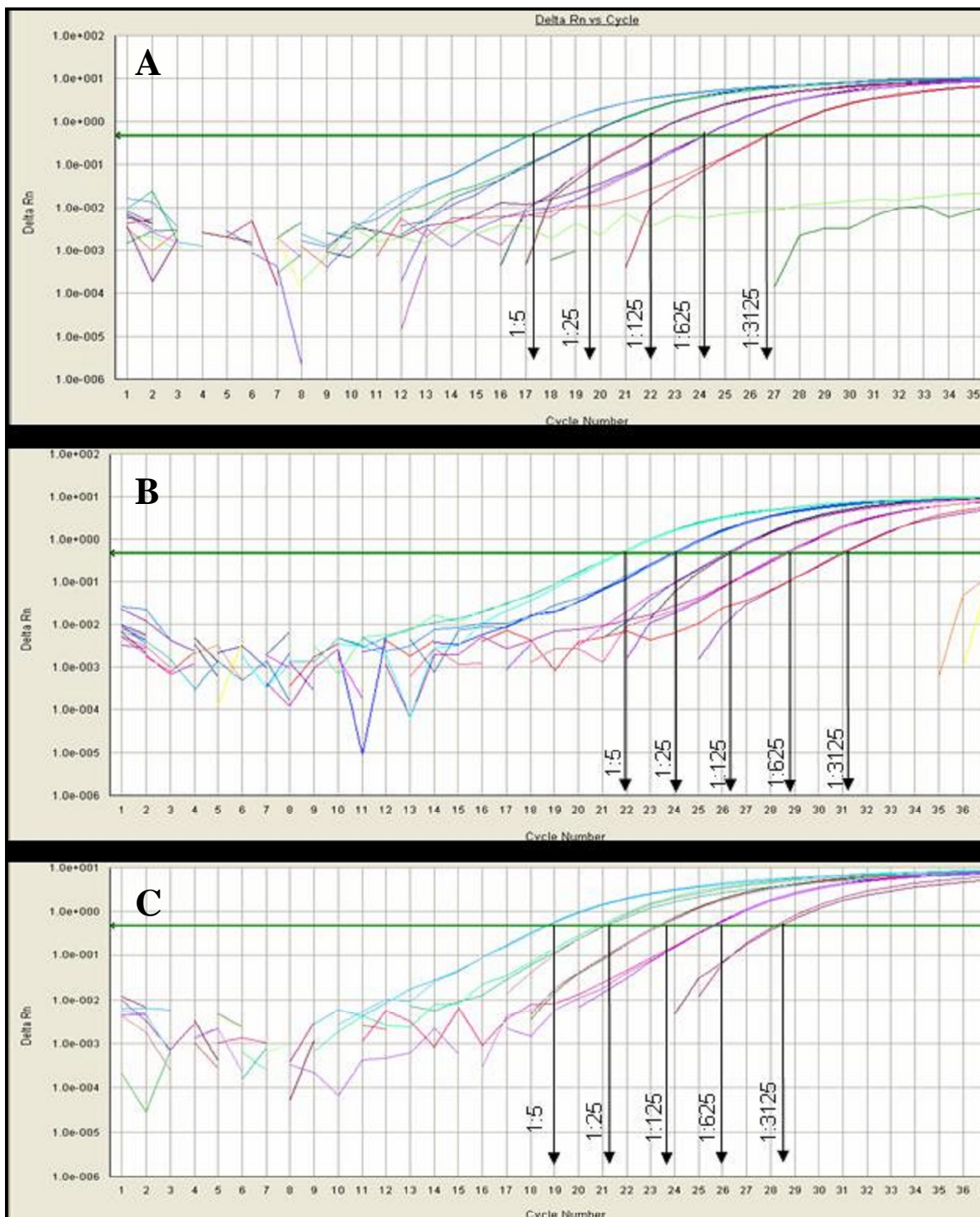
## V4 Real Time PCR

### V.4.1 Curvas de amplificação

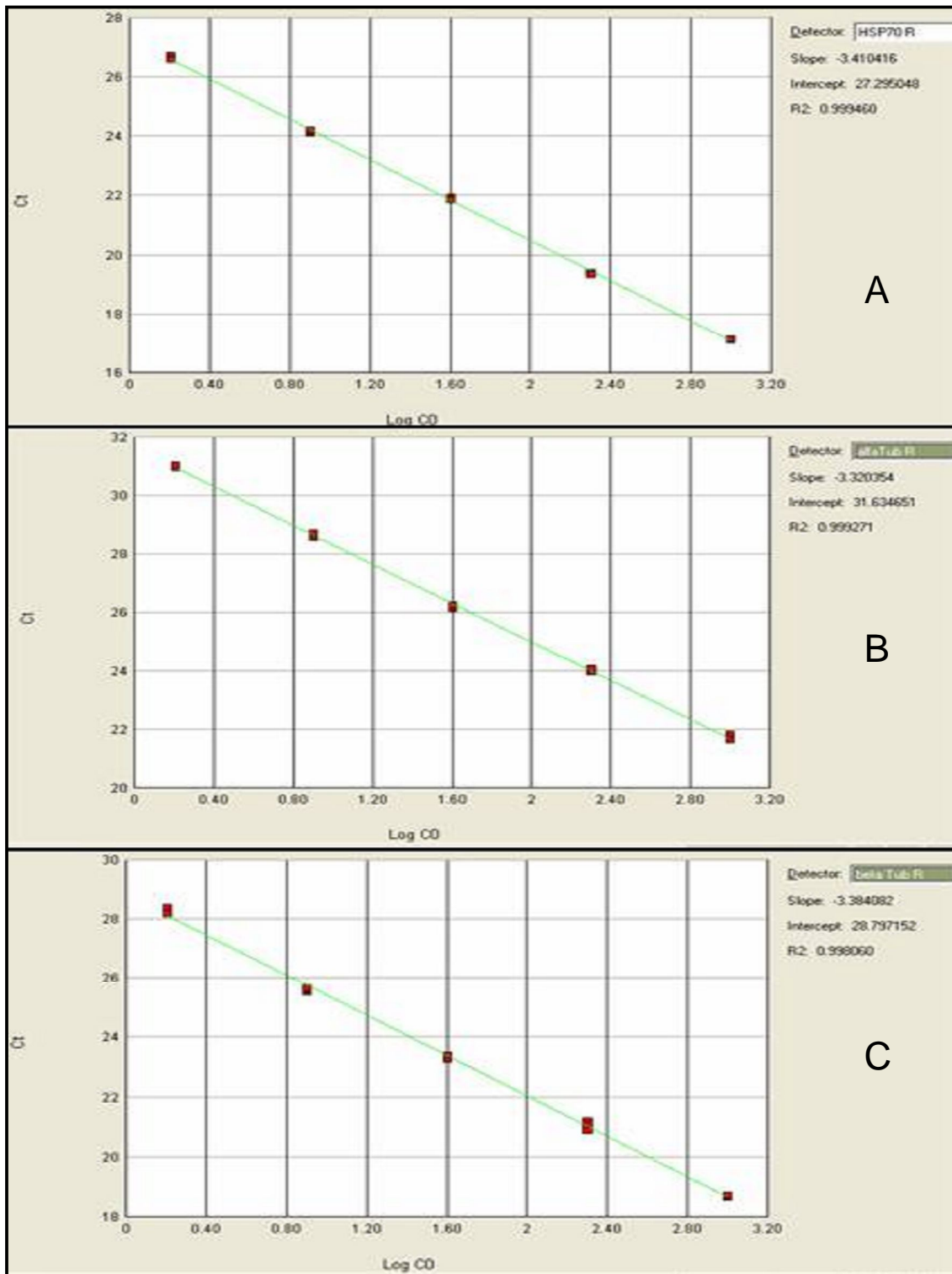


Curvas de amplificação do HSP70, alfa e beta tubulina para os isolados a 25 e 36°C. A: amostras T4B17, T10B1, T13LN2 e S1baço, B: amostras Bt84, Bt85, Pb265 e D01 e C: Pb-cão

#### V.4.2 Reação para cálculo da eficiência de cada par de primer

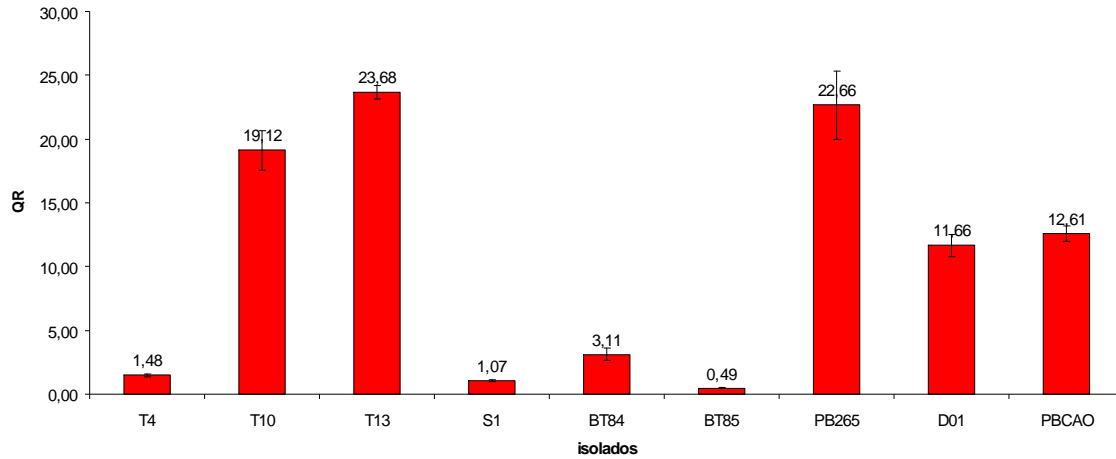


Curvas de amplificação, para HSP70 (A), Alfa – tubulina (B) e Beta – tubulina (C), obtidas pela diluição em série do cDNA. O Ct correspondente a cada diluição esta representado pelas setas verticais.



Curvas padrão obtidas pela diluição em serie do cDNA para cálculo de eficiência dos primers da hsp70 (A), alfa (B) e beta tubulina (C). Eixo y apresenta valor de Ct e o eixo x log da concentração de cDNA.

**V.5 Expressão do gene hsp70, segundo os valores de QR, em relação ao aumento de temperatura, usando como a beta tubulina.**



No eixo x estão os isolados e no y estão os valores de quantas vezes mais o gene hsp70 é expressa em função do aumento de temperatura.

## VI Discussão Geral

Foi possível observar ampla variabilidade fenotípica no que se refere aos estudos morfométricos, de transição M-L e de termo tolerância entre os isolados. O dimorfismo e a termo tolerância são considerados fatores de virulência que possibilitam a adaptação do patógeno às diferentes condições impostas pelo hospedeiro, como aumento de temperatura, influências hormonais e resposta imune (KUROKAWA et al., 1998). Diferentes padrões de dimorfismo e termo tolerância poderiam refletir interações patógeno-hospedeiro distintas, como por exemplo uma maior ou menor virulência, aspectos clínicos distintos, etc. Alguns fatores de virulência, como o dimorfismo, poderiam ser frutos de uma seleção natural resultante da interação entre os dois genótipos: o do patógeno e do hospedeiro (LEDERBERG, 1999). Evidências também têm sido apontadas de que algumas características consideradas fatores de virulência e patogenicidade em fungos dimórficos poderiam ter tido sua origem e manutenção no meio saprofítico (em geral solo) através da interação destes patógenos com microrganismos fagocíticos predadores, de forma que uma mesma característica adaptativa, como por exemplo a resistência lítica celular, poderia desempenhar papéis distintos durante o saprofitismo e durante o parasitismo (CASADEVALL et al., 2003 e STEENBERGEN et al 2003; 2004). A própria HSP70, considerada fator de virulência, por estar associada ao choque térmico, tem funções outras na fisiologia celular do microrganismo em condições ambientais, que não implicam diretamente em patogenicidade, sendo esta, na verdade, uma consequência e não causa da expressão do gene.

A descoberta de três espécies crípticas de *P. brasiliensis* (MATUTE et al., 2006) proporcionou um segundo enfoque para este projeto que seria detectar alguma diferença fenotípica (quanto aos caracteres morfológicos e de expressão do gene *hsp70*) e/ ou molecular (seqüências do gene *hsp70*) entre isolados de pelo menos 2 espécies diferentes aqui



estudadas. Sabe-se que os isolados T10 e Bt84 pertencem à espécie PS2 e os isolados T4 e T13 à espécie S1. Os demais isolados utilizados neste trabalho não foram analisados no trabalho de Matute et al (2006). Apesar do reconhecimento filogenético de espécie ser o método mais eficaz de se identificar espécie em microrganismo, a detecção de fenótipos variáveis entre as diferentes espécies em *P. brasiliensis* passa a ser atrativa para um rápido reconhecimento de espécie.

Em *P. brasiliensis*, existem muitos fenótipos variáveis, como crescimento, aspecto de colônia miceliana, produção de conídios, transição micélio/levedura, microscopia leveduriforme (brotamentos, forma e tamanho das células, etc), virulência, termotolerância, entre outros (THEODORO et al., 2005). Se as espécies estão separadas geneticamente é de se esperar que com o passar do tempo esta divergência seja detectada por diferenças morfológicas que se traduzem em exploração de diferentes nichos ecológicos, tanto durante a fase saprofítica como durante a fase de parasitismo.

Os dados morfométricos de área de células leveduriformes, apesar de não apresentarem diferenças significativas entre isolados, mostraram a grande plasticidade fenotípica de cada isolado quanto ao tamanho das células leveduriformes, merecendo destaque o isolado Pbcão que apresentou a maior amplitude de área. Este isolado também se destaca dos demais pelo fato de sua colônia leveduriforme não apresentar aspecto cerebriforme como os demais isolados do laboratório, sua colônia é lisa e de crescimento lento (dado não mostrado).

A forma das células leveduriformes também é variável, na maior parte dos isolados se aproxima de uma circunferência, entretanto o isolado Bt84 se destacou por apresentar leveduras demasiadamente alongadas, semelhantes à pseudohifas. Observou-se também a tendência de alongamento, nos brotamentos das leveduras do isolado T10B1. Mais estudos

ainda são necessários, envolvendo mais cepas da espécie PS2 e das outras duas espécies, para se avaliar com maior clareza a significância desta característica como diagnóstico fenotípico.

Curiosamente os isolados Bt84 e T10B1 foram os únicos que se apresentaram na forma micelial, sem qualquer sinal de transição M-L a 32°C. Com relação ao tempo necessário para a transição M-L, o T10B1 apresentou uma transição intermediária e o Bt84, converteu para levedura tardiamente, mostrando significativa diferença com relação aos demais isolados. Especula-se que a demora em se adquirir a forma de levedura seja devido à “dificuldade” ou “baixa capacidade” deste isolado em atingir forma arredondada de levedura.

A produção de arthroconídias foi um resultado inesperado observado nas lâminas de micro cultivo para determinação da temperatura de transição de cada isolado, já que trabalhos mais antigos apontam certa dificuldade na obtenção das mesmas, sendo necessárias condições especiais, de baixa temperatura (cerca de 22°C) e escassez de nutrientes (Agar - água) (BUSTAMANTE-SIMON et al., 1985). Entretanto as condições aqui empregadas foram opostas, ou seja, temperatura alta (30°C) e meio relativamente rico em nutrientes (GPY). Talvez a alta temperatura tenha sido uma condição de estresse que proporcionou produção de arthroconídias em alguns isolados. A alta produção de conídias, como a encontrada na cepa Bt85, se repete de forma ainda mais exuberante em meio Agar extrato de solo (TERÇARIOLI et al, 2005). Segundo estudos desenvolvidos no laboratório, todos os isolados são capazes de produzir conídias em meio Agar extrato de solo, porém em quantidades distintas, mas proporcionais às obtidas no meio GPY. Os isolados T10B1 e BT84, pertencentes a espécies PS2, também não produzem arthroconídias em Agar extrato de solo (TERÇARIOLI et al, 2005). Maiores estudos sobre o comportamento em solo de isolados das três espécies crípticas deverão ser realizados.

Quanto aos clamidoconídios, houve grande dificuldade em distingui-los da célula leveduriforme, já que são conídios predominantemente intercalares, arredondados e de parede

celular mais espessa que a célula miceliana. A formação dos clamidoconídios aumenta com a elevação da temperatura para 36°C (SALAZAR & RESTREPO, 1984). San Blas et al (1982) descreveram quatro etapas na transformação M-L, a primeira só apresentando formas miceliais, com ou sem clamidósporos, a segunda com estruturas similares a leveduras (não necessariamente derivadas de clamidósporos), a terceira com leveduras em cadeia, sem presença de hifas e quarta com leveduras desprendidas contendo multibrotamento.

Com relação aos dados moleculares, observou-se, como já esperado, pouco polimorfismo no gene *hsp70*, considerado filogeneticamente conservado. Como os resultados de PCR-RFLP não proporcionaram nenhum polimorfismo de restrição, e como não foi possível amplificar o intron 1 (a idéia inicial era sequenciar os introns) optou-se por sequenciar as pontas do gene, de modo a incluir os introns 1 e 2. O sequenciamento foi essencial para a análise do gene, pois mostrou polimorfismos entre as seqüências obtidas e a seqüência depositada no GenBank. Um dos polimorfismos envolveu um único nucleotídeo localizado no sítio de anelamento do *primer* HHA (antisense do PCR do intron 1) de Da Silva et al (1999), o que explica a não amplificação do intron 1 em nossos experimentos. Além disso, a localização de sítios variáveis entre as seqüências dos nove isolados foi importante para a confecção dos *primers* a serem usados para Real Time PCR.

O gene *hsp70* é um membro pertencente a uma família gênica que em *P. brasiliensis* é composta de pelo menos quatro membros já descritos (FLOREZ et al., 2003). Sabe-se que famílias de genes evoluíram através de uma série de duplicações gênicas, portanto o uso do termo homologia para estes casos se torna um tanto grosseiro. É necessário diferenciar os genes destas famílias em ortólogos e parálogos. Genes ortólogos, em um conjunto de duplicatas, são duas cópias do mesmo gene, do mesmo locus; genes parálogos são dois genes, também homólogos, porém em loci diferentes. Inferências filogenéticas devem ser baseadas em genes ortólogos, mas pode haver perda de genes ao longo da evolução e erroneamente

genes parálogos serem comparados, quando isso ocorre, a árvore gênica ou genealogia de genes difere da árvore filogenética (RIDLEY, 2006).

Sendo assim, a comparação e o alinhamento de seqüências feito neste projeto só resultariam em dados confiáveis caso os genes hsp70 amplificados fossem de fato ortólogos. Segundo informações pessoais fornecidas pela professora Silvana Petrofeza os *primers* por ela desenhados (que foram os mesmos usados para o PCR e sequenciamento parcial do gene neste trabalho) são específicos para um membro da família hsp70, não amplificando os demais. As diferenças observadas entre as seqüências dos nove isolados e a seqüência depositada podem ser explicadas pelo fato de que o isolado usado por Da Silva et al (1999), Pb01, apresenta inúmeras divergências, mesmo em outras regiões gênicas, quando comparado com outros isolados. Este isolado não foi avaliado filogeneticamente por Matute et al (2005), portanto não se sabe a qual espécie críptica ele pertence. Novos estudos comparativos morfológicos e moleculares, a serem realizados em nosso laboratório, deverão incluir também este isolado.

Na análise filogenética por Neighbour Joining observou-se o agrupamento dos isolados T10B1 e Bt84, corroborando com dados anteriormente obtidos em nosso laboratório, pelo sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 (HEBELER-BARBOSA et al., 2003b) que permitiu a separação dos isolados de *P. brasiliensis* em dois grupos genéticos: em um estão os isolados T10 e Bt84 e no outro estão os isolados T3, Bt60, T15, Bt85, T13, T4, T5, T8, Pb265, T1, T9 e T7.

Os agrupamentos feitos com base nos caracteres morfológicos não foram totalmente similares ao agrupamento molecular, mesmo porque, as características aqui avaliadas envolvem ativação e inibição de muitos outros genes (Da SILVA et al., 1994).

Com relação à análise de expressão do hsp70 por Real Time observou-se significativa diferença entre a expressão de alguns dos isolados quando utilizado como controle endógeno

a alfa e a beta tubulina. Estes endógenos, juntamente com o gene 18S são os mais usados para análise de expressão de uma série de genes em *P. brasiliensis* (GOLDMAN et al., 2003 e MARQUES et al., 2004). Embora não se possa excluir a possibilidade destes genes terem sua expressão também modulada pelo aumento de temperatura, esta escolha foi feita com base nos principais trabalhos de expressão gênica após aumento de temperatura de 25 para 36°C. O fato de encontrarmos diferentes expressões de hsp70 quando usamos alfa e beta tubulina como endógenos aponta para a importância de um estudo mais seletivo para genes candidatos a normalizadores. Como o gene normalizador mais usado é a alfa tubulina (GOLDMAN et al., 2003 e MARQUES et al., 2004), optou-se por discutir os resultados com base neste gene.

Os isolados Pb265 e T13 apresentaram os maiores aumentos de transcrição da hsp70 após o aumento de temperatura e ambos isolados mostraram maior viabilidade (termotolerância conforme aumento de temperatura até 42°C), juntamente com os isolados T10, S1, que também apresentaram alta expressão de hsp70. Apesar do isolado T4 ter sido agrupado dentre os isolados com maior viabilidade, ou seja, uma maior termotolerância, sua expressão se apresentou inferior a alguns dos demais isolados pertencentes ao grupo de menor viabilidade. O isolado D01, por sua vez, apresentou uma alta expressão de hsp70 e uma queda acentuada da viabilidade com o aumento da temperatura.

Quanto à virulência, observou-se algumas dificuldades em classificar os isolados, visto que foram analisadas contagens de UFCs em três órgãos diferentes, em dois períodos diferentes. Decidiu-se manter apenas duas classes, uma de alta virulência, na qual são incluídos os isolados Pbcão, T10, T13 e S1 e outra de virulência intermediária-baixa, na qual são incluídos os isolados BT84, BT85, T4 e Pb265. Nenhuma correlação pôde ser observada entre o perfil de virulência e a expressão de hsp70, negando a hipótese inicial de que altos níveis de expressão desta hsp estariam associados à virulência, como foi sugerido para *Histoplasma capsulatum* (CARUSO et al., 1987).

Ainda assim, o emprego destes genes para confecção de vacinas parece ser de grande interesse visto o potencial imunomodulador destas proteínas. Porém, o fato de se ter encontrado alguns polimorfismos entre os nossos isolados, e principalmente entre estes e a sequência depositada no GenBank, levanta a questão acerca de quão conservado é este gene, já que foi possível observar claramente a segregação entre as duas espécies crípticas na árvore de Neighbour Joining (os isolados T10 e BT84 pertencem a uma espécie, segundo Matute et al, 2006). Além disso, o fato de a amplitude de expressão do gene hsp70 ser consideravelmente grande entre os diferentes isolados, aponta para a importância de se testar diferentes isolados na avaliação do efeito protetor destas vacinas.

A importância dos estudos comparativos, contemplados por este projeto, tanto morfológicos como moleculares, aumentou ainda mais com a descoberta das três espécies crípticas de *P. brasiliensis* (MATUTE et al., 2006). Sabe-se que o isolamento genético é seguido de divergências (morfológicas e fisiológicas) entre as recentes espécies, o que pode se traduzir na ocupação de diferentes nichos ecológicos, já que teoricamente espécies diferentes não ocupam o mesmo nicho ecológico, ou seja, não exploram as condições e recursos do meio de forma semelhante. Segundo este estudo e outros realizados em nosso laboratório (TERÇAROLI et al., 2006), os isolados BT84 e T10 (pertencentes a uma das espécies crípticas de *P. brasiliensis*) parecem não produzir conídios e terem leveduras mais alongadas, porém estes dados são ainda não conclusivos, necessitando maiores estudos. Os dados até então obtidos indicam que estes genótipos do grupo PS2 devem ocorrer de forma bem menos freqüente que os genótipos do grupo S1, tanto em hospedeiros humanos como nos tatus (MATUTE et al., 2006). Particularmente em nossos isolados de tatus, todos provenientes de uma mesma região hiperendêmica, esta proporção é de 1:9. Esta menor freqüência de isolamento de isolados da espécie PS2 poderia ser explicada pela menor capacidade ou a não produção de conídias infectantes neste grupo? Poderiam ainda estes

genótipos estarem associados aos eventuais casos de infecção pela via traumática e não inalatória como na maioria das infecções por PCM? Maiores estudos com maior número de isolados são ainda necessários de forma a se identificar possíveis características morfológicas, moleculares, fisiológicas e ecológicas associadas aos genótipos espécie-específicos do *P.brasiliensis*, e de especial interesse aquelas relacionadas aos diferentes perfis de manifestação da doença no homem.

Sabe-se que nas espécies crípticas de *H. capsulatum* pode-se detectar diferenças morfológicas e fisiológicas entre isolados pertencentes às diferentes espécies (KASUGA et al., 2003). No caso do *Coccidioides*, observou-se que a espécie *C. posadasii* cresce mais lentamente em meio contendo alta concentração de sais quando comparada com a espécie *C. immitis*, porém este fenótipo não é usado como diagnóstico (FISHER et al., 2002).

Entender melhor esta diversidade de isolados de *P. brasiliensis* significa compreender de forma mais abrangente a dinâmica populacional, as diferentes formas clínicas e a importância de se considerar o *P. brasiliensis* não como uma única cepa, mais sim como um conjunto complexo de genótipos que devem ser levados em consideração nas medidas terapêuticas e profiláticas.

## VII Referências Bibliográficas

- ALBORNOZ, M.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v.9, p.248-53, 1971.
- ANDERSSON, A., RASOOL, O., SCHMIDT, M., KODZIUS, R., FLUCKIGER, S., ZARGARI, A., CRAMERI, R., SCHEYNIUS, A. Cloning, expression and characterization of two new IgE-binding proteins from the yeast *Malassezia sympodialis* with sequence similarities to heat shock proteins and manganese superoxide dismutase. **Eur. J. Biochem.**, v.271, p.1885-94, 2004.
- ARISTIZABAL, B.H., CLEMONS, K.V., STEVENS, D.A., RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: In vivo inhibition in females. **Infect. Immun.**, v.66, p.5587-91, 1998.
- BAGAGLI, E., SANO, A., COELHO, K.I.R., ALQUATI, S., MIYAJI, M., CAMARGO, Z.P., GOMES, G., FRANCO, M., MONTENEGRO, M.R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med & Hyg.**, v.58, p.505-12, 1998.
- BAGAGLI, E., FRANCO, M., BOSCO, S. M. G., HEBELER-BARBOSA, F., TRINCA, L. A., MONTENEGRO, M. R. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillo (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med. Mycol.**, v.41, p.217-23, 2003.
- BAGAGLI, E., BOSCO, S.M.G., THEODORO, R.C., FRANCO, M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect. Genet. Evol.**, v.6, p.344-51, 2006.



- BARDWELL, J.C.A., CRAIG, E.A. Major heat shock gene of *Drosophila* and *Escherichia coli* heat-inducible DNA gene are homologous. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.81, p.848–52, 1984.
- BISIO, L.C., SILVA, S.P., SILVA-PEREIRA, I., XAVIER, M.A.S., PUCCIA, R., VENÂNCIO, E.J., SOARES, C.M.A., FELIPE, M.S.S. A new member of *Paracoccidioides brasiliensis* 70 kDa heat shock protein family reacts with paracoccidioidomycosis patient sera. **Med. Mycol.**, v.43, p.1-9, 2005.
- BORGES-WALSMLEY, M.L., CHEN, D., SHU, X., WALSMLEY, A.R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends. Microbiol.**, v.25, p.3389-402, 2002.
- BORCHIellini, C., BOURY-ESNAULT, N., VACELET, J., PARCO, Y.L. Phylogenetic Analysis of the Hsp70 Sequences Reveals the Monophyly of Metazoa and Specific Phylogenetic Relationships Between Animals and Fungi. **Mol. Biol. Evol.**, v.15(6), p.647–55, 1998.
- BOSCO, S.M.G., THEODORO, R.C., MACORIS, S.A.G., FARIAS, M.R., MURO, M., RIBEIRO, M. G., BAGAGLI, E. Morphological and molecular characterization of the first isolate of *Paracoccidioides brasiliensis* from dog (*Canis familiaris*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.47(14), p.62-3, 2005.
- BULMER, G.S. & FROMTLING, R.A. Pathogenic mechanisms of mycotic agents. In: HOWARD, D.H. & HOWARD, L.F., (Eds). **Fungi pathogenic for humans and animals**. New York, Marcel Dekker, 1983. v3, p.1-59.
- BURNIE, J.P., CARTER, T.L., HODGETTS, S.J., MATTHEWS, R.C. Fungal heat-shock proteins in human disease. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.30, p.53-88, 2006.

- BUSTAMANTE –SIMON, B., McEWEN, J.G., TABARES, A.M., ARANGO, M., RESTREPO-MORENO, A. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.23, p.407-14, 1985.
- CADAVID, D., RESTREPO, A. Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia. **Epidemiol. Infect.**, v.111, p.121-33, 1993.
- CARUSO M, SACCO M, MEDOFF G, MARESCA B. Heat shock 70 gene is differentially expressed in *Histoplasma capsulatum* strains with different levels of thermotolerance and pathogenicity. **Mol Microbiol.**, v.1(2), p.151-8, 1987.
- CASADEVALL, A., PIROFSKI, L.A. Host-Pathogen Interactions: redefining the Basic Concepts of Virulence and Pathogenicity. **Am. Soc. Microbiol.**, v.67, p.3703-13, 1999
- CASADEVALL, A., STEENBERGEN, J.N., NOSANCHUK, J.D. “Ready – made” virulence and “dual use” virulence factors in pathogenic environmental fungi – The *Cryptococcus neoformans* paradigm. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.6, p.332-7, 2003.
- COHEN, I.R. Peptide therapy for type I diabetes: the immunological humunculus and the rationale for vaccination. **Diabetol.**, v.45, p.1468-74, 2002.
- COOPER, G. M. **A célula: Uma Abordagem Molecular**. 2 ed. Porto Alegre, Artmed, 1991, 314-8p.
- CORREDOR, G. G., CASTAÑO, J. H., PERALTA, A., DÍEZ, S., ARANGO, M., McEWEN, J., RESTREPO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in na endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.16(4), p.216-20, 1999.

- CORREDOR, G.G., PERALTA, L.A., CASTAÑO, J.H., ZULUAGA, J.S., HENAO, B., ARANGO, M., TABARES, A.M., MATUTE, D.R., MCEWEN, J.G., RESTREPO, A. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. **Med. Mycol.**, v.43(3), p.275-80, 2005.
- CUNHA, D.A., ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M., FELIPE, M.S.S., SALEM-IZACC, S.M., DEEPER Jr, G.S., SOARES, C.M.A. Heterologous expression, purification and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clin. Diag. Lab. Immun.**, v. 9, p.374-7, 2002.
- Da SILVA, S.P., BORGES-WALMSLEY, M.I., PEREIRA, SOARES, C.M.A., WALMSLEY, A.R., FELIPE, M.S.S. 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.**, v.31(4), p.1039-50, 1999.
- Da SILVA, S.P., FELIPE, M.S.S., PEREIRA, M., AZEVEDO, M.O, SOARES, C.M.A. Phase transition and stage specific protein synthesis in the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Exp. Mycol.**, v.18, p.294-9, 1994.
- DIEZ, S., GÓMEZ, B.L., RESTREPO, A., HAY, R.J. AND HAMILTON, A.J. *Paracoccidioides brasiliensis* 87-kilodalton antigen, a heat shock protein useful in diagnosis: characterization, purification, and detection in biopsy material via immunohistochemistry. **J. Clin. Microbiol.**, v.40., p.359-65, 2002.
- DIEZ, S., GOMEZ, B.L., MCEWEN, J.G., RESTREPO, A., HAY, R.J. AND HAMILTON, A.J. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant 27-kilodalton and purified 87-kilodalton antigens in an enzyme-linked immunosorbent

- assay for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, p.1536-42, 2003.
- DRUTZ, D.J. & HUPPERT, M. Coccidioidomycosis: factors affecting the host-parasite interaction. **J. infect. Dis.**, v.147, p.373-90, 1983.
- DRUTZ, D.J., HUPPERT, M., SUN, S.H., MCGUIRE, W.L. Human sex hormones stimulate the growth and maturation of *Coccidioides immitis*. **Infect. Immun.**, v.32, p.897-907, 1981.
- FARIAS, M.R., WERNER, J., MURO, M. D., MARQUES, S.A., MARQUES, M.E.A., FRANCO, M.F., RIBEIRO, M.G., CUSTODIO, C. C., CONDAS, L.A. Z., BOSCO, S.M.G., BAGAGLI, E. Canine paracoccidioidomycosis: case report of generalized lymphadenitis. **Rev.Inst. Med. Trop., S. Paulo**, v.47(14), p.64, 2005.
- FELDMAN, D., DO, Y., BURSHELL, A., STATHIS, P., LOOSE, D.S. An estrogen-binding protein and endogenous ligand in *Sacchomyces cerevisiae*: possible hormone receptor system. **Science**, v.218, p.297-8, 1982.
- FELIPE, M.S., ANDRADE RV, PETROFEZA SS, et al. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. **Yeast**, v.20(3), p.263-71, 2003.
- FERREIRA, M. S.; FREITAS, L. S.; LACAZ, C. S.; DEL NEGRO, G. M.; AIELO, N. T.; GARCIA, M. N.; ASSIS, C. M.; SALEBIAN, A.; HERIS-VACCARI, E. M. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from dog food probaly contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.38, p.253-6, 1990.
- FISHER, M.C., KOENIG, G.L., WHITE, T.J., TAYLOR, J.W. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. **Mycol.**, v.94 (1), p.73-84, 2002.

- FLOREZ, A.M., OVIEDO, A., CARDONA, A., HERRERA, M., GARCIA, E., RESTREPO, A. AND MCEWEN, J.G. Molecular cloning and characterization of two hsp 70 homologous genes from the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Biomed.**, v.23, p.424-36, 2003.
- FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p.5-18, 1987.
- FRANCO, M., BAGAGLI, E., SCAPOLIO, S., LACAZ, C.S. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Med. Mycol.**, v.38, p.185-91, 2000.
- FRANZOT, S.P., MUKHERJEE, J., CHERNIAK, R., CHEN, L.C., HAMDAN, J.S., CASADEVALL, A. Microevolution of a standard strain of *Cryptococcus neoformans* resulting in differences in virulence and other phenotypes. **Infect. Immun.**, v.66, p.89-97, 1998.
- FRIES, B.C., GOLDMAN, D.L., CASADEVALL, A. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans*. **Microbe Infect**; v.4, p.1345-52, 2002.
- FUTUYAMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. 2 ed. Ribeirão Preto. Funpec, 2002, 117p.
- GESUELE, E. Aislamento de *Paracoccidioides sp.* De heces de pinguino de la Antártida. In: INTERNATIONAL MEETING ON PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS, 4. 1989, **Proceedings...** Caracas, 1989. Abstract B2.
- GILBERT, C.S., VAN DEN BOSCH, M., GREEN, C.M., VIALARD, J.E. AND GRENON, M. ERDJUMENT-BROMAGE H, TEMPST P, LOWNDES NF. The budding yeast Rad9 checkpoint complex: chaperone proteins are required for its function. **EMBO J.**, v.4, p.953-8, 2003.

- GOLDMAN GH, DOS REIS MARQUES E, DUARTE RIBEIRO DC, DE SOUZA BERNARDES LA, QUIAPIN AC, VITORELLI PM, SAVOLDI M, SEMIGHINI CP, DE OLIVEIRA RC, NUNES LR, TRAVASSOS LR, PUCCIA R, BATISTA WL, FERREIRA LE, MOREIRA JC, BOGOSSIAN AP, TEKAIA F, NOBREGA MP, NOBREGA FG, GOLDMAN MH. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. **Euk. Cell.**, v.2(1), p.34-48, 2003.
- GOMEZ, F. J., ALLENDOERFER, R., DEEPE, G. J. Jr. Vaccination with recombinant Heat Shock Protein 60 from *Histoplasma capsulatum* protects mice against pulmonary histoplasmosis. **Infec. Immun.**, v.63, p.2587-95, 1995.
- GROSE, E.; TAMSITT, J. R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia. **Sabouraudia**, v.4, p.124-5, 1965.
- GUPTA, R.S., SINGH, B. Cloning of the HSP70 Gene from Halobacterium marismortui: Relatedness of Archaeobacterial HSP70 to Its Eubacterial Homologs and a Model for the Evolution of the HSP70 Gene. **J. Bacteriol.**, v.174, p.4594-605, 1992
- HEBELER-BARBOSA, F., MONTENEGRO, M.R., BAGAGLI, E. Virulence profiles of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos (*Dasybus novemcinctus*). **Med. Mycol.**, v.41, p.89-96, 2003a.
- HEBELER-BARBOSA, F., MORAIS, F. V., MONTENEGRO, M. R., KURAMAE, E. E., TAYLOR, J. W., MONTES, B., MCEWEN, J. G., PUCCIA, R., BAGAGLI, E. Sequence comparison of the internal transcribed spacer regions and gp 43 in *Paracoccidioides brasiliensis* for patients and armadillos *Dasybus novemcinctus*. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, p.5735-37, 2003b.

- HOGAN, L.H., KLEIN, B.S., LEVITZ, S.M. Virulence factors of medically important fungi. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.9, p.469-88, 1996.
- IZACC, S.M.S., GOMEZ, F.J., JESUINO, R.S.A., FONSECA, C.A., FELIPE, M.S.S., DEEPE, G.S., SOARES, C.M.A. Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v.39, p.445-55, 2001.
- JIMENEZ-LUCHO, V., GINSBURG, V., KRIVAN, H.C. *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* and other fungi bind specifically to the glycosphingolipid lactosylceramide (Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer), a possible adhesion receptor for yeasts. **Infect. Immun.**, v.58, p.2085-90, 1990.
- KASUGA, T., TAYLOR, J.W., WHITE, T.J. Phylogenetics relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* darling. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, p.653-63, 1999.
- KASUGA, T., WHITE, T.J., KOENIG, G., MCEWEN, J., RESTREPO, A., CASTAÑEDA E., LACAZ, C.S., HEINS-VACCARI, E.M., FREITAS R.S., ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M., QIN, Z., NEGRONI, R., CARTER, D.A., MIKAMI, Y., TAMURA, M., TAYLOR, M.L., MILLER, G.F., POONWAN, N., TAYLOR, J.W. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Mol. Ecol.**, v.12, p.3383-401, 2003.
- KIESSLING, R., GROWBUG, A., IVANYI, J., SODERSTRÖUM, K., FERM, M. KLEINAU, S. NILSSON, E. KLARESKOG, L. Role of hsp60 during autoimmune and bacterial inflammation. **Immunol. Rev.**, v.121, p. 91-111, 1991.
- KLEIN, B.S., HOGAN, L.H., JONES, J.M. Immunological recognition of a 25-amino acid repeat arrayed in tandem on a major antigen of *Blastomyces dermatitidis*. **J. clin. Invest.**, v.92, p.330-7, 1993.

- KOUFOPANOU, V., BURT, A., SZARO, T., TAYLOR, J.W. Gene genealogies, cryptic species, and molecular evolution in the human pathogen *Coccidioides immitis* and relatives (Ascomycota, Onygenales). **Mol. Biol. Evol.**, v.18, p.1246-58, 2001.
- KREGEL, K. Molecular Biology of Thermoregulation Invited Review:Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. **J. Appl. Physiol.**, v.92, p.2177–86, 2002.
- KUROKAMA, C.S., SUGIZAKI, M.F., PERÇOLI, M.T.S. Virulence Factors in fungi of systemic mycoses. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.40(3), p.125-35, 1998.
- KWON-CHUNG, K.J. Comparison of isolates of *Sporotrix schenckii* obtained from fixed cutaneous lesions with isolates from other types of lesions. **J. infect. Dis.**, v.139, p.424-31, 1979.
- LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C. Paracoccidioidomycose In: LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C. **Micologia médica**. São Paulo: Sarvie, 1984, 189-216p.
- LACHKE, S.A., JOLY, S., DANIELS, K., SOLL, D.R. Phenotypic switching and filamentation in *Candida glabrata*. **Microbiol.** v.148, p.2661-74, 2002.
- LEDBERG, J. Paradoxes of the Host-Parasite Relationship. **ASM News**, v.65, p.811-6, 1999.
- LINDQUIST, S. The heat-shock response. **Annu. Rev. Biochem.**, v.55, p.1151–91, 1986.
- LIMA, K.M., SANTOS, S.A., SANTOS, R.R.Jr, BRANDÃO, I.T., RODRIGUES, J.M.Jr, SILVA, C.L. Efficacy of DNA-hsp65 vaccination for tuberculosis varies with method of DNA introduction in vivo. **Vaccine**, v.22, p.49-56, 2003.
- LOUGHRY, W.J., McDONOUGH, C.M. Spatial patterns in a population of nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **Am. Midl. Nat.**, v.140, p.161- 9, 1998.



- MACEDO, R.C.L., LAZERA, M.S., TRILLES, L., BULCÃO, A.S., SILVA Jr, N.J., OLIVEIRA, N.A., WANKE, B. *Paracoccidioides brasiliensis*- In: VII INTERNATIONAL MEETING ON PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS, 1999, Campos do Jordão. Proceedings...São Paulo: Brasil, 1999. p.128.
- MACORIS S.A.G., SUGIZAKI, M.F., PERAÇOLI, M.T.S., BOSCO, S.M.G., HEBELER-BARBOSA, F., SIMÕES, L.B., THEODORO, R.C., TRINCA, L.A., BAGAGLI, E. Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos and patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.10(3), p.331-4, 2006.
- MARESCA, B., KOBAYASHI, G.S. Hsp70 in parasites: as an inducible protective protein and as an antigen. **Experientia**, v.50, p.1067-74, 1994.
- MARQUES, E.R., FERREIRA, M.E.S., DRUMMOND, R.D., FELIX, J.M., MENOSSI, M., SAVOLDI, M., TRAVASSOS, L.R., PUCCIA, R., BATISTA, W.L., CARVALHO, K.C., GOLDMAN M.H.S., GOLDMAN, G.H. Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. **Mol. Gen. Genom.**, v.271, p.667-77, 2004.
- MARQUES, S.A., CAMARGO, R.M.P. Paracoccidioidomicose. In: ZAITZ, C., CAMPBELL, I., MARQUES, S.A., RUIZ, L.R.B., SOUZA, V.M. (Eds). **Compêndio de Micologia Médica**. 1. ed. Rio de Janeiro, MEDSI, 1998. 231p.
- MARTIN, A.P., BURG, T.M. Perils of Paralogy: Using HSP70 genes for Inferring organismal Phylogenies. **Syst. Biol.**, v.51, p.570-587, 2002.
- MATUTE, D.R., McEWEEN, J.G., MONTES, B.A, SAN-BLAS, G., BAGAGLI, E., RAUSCHER, J.T., RESTREPO, A., MORAIS, F., NINO-VEJA, G., TAYLOR,

- J.W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol. Biol. Evol.**, v.23, p.65-73, 2006.
- McEWEN, J.G., BEDOYA, V., PATINO, M.M., SALAZAR, M.E., RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J Med Vet Mycol**, v.25, p.165-75, 1987.
- MEDOFF, G. MARESCA, B., LAMBOWITZ, A.M., Kobayashi, G., Painter, A., Sacco, M., Carratu, L. Correlation between pathogenic and temperature sensitive in different strains of *Histoplasma capsulatum*. **J. clin. Invest.**, v.78, p.1638-47, 1986.
- MENDES, R.P. The gamut of Clinical Manifestations. In: FRANCO, M., LACAZ, C.S., RESTREPO-MORENO, A., DEL NEGRO, G. (Eds). Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press, 1994, 233-57p.
- MENDES-GIANINNI, M.J.S., MORAES, R.A., RICCI, T.A. Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.32, p.384-5, 1990.
- MORAIS, F.V., BARROA, T.F., FUKADA, M.K., CISALPINO, P.S., PUCCIA, R. Polymorphism in the Gene Coding for the Immunodominant Antigen gp43 from the Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.3960-6, 2000.
- NAIFF, R. D., FERREIRA, L. C. P., BARRTE, T. V., NAIFF, M. F. AND ARIAS, J. R. Paracoccidioidomycose enzoótica em tatus (*Dasyus novemcinctus*) no Estado do Pará. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.28, p.19-27, 1986.
- NEGRONI, P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprotificamente en el suelo Argentino. **Prensa Med. Argent.**, v.53, p.2381-2, 1966.
- NICOLA, A.M., ANDRADE, R.V., SILVA-PEREIRA, I. Molecular chaperones in the *Paracoccidioides brasiliensis*. **Genet. Mol. Res.**, v.4(2), p.346-57, 2005.

- ODDS, F.C. *Candida albicans* proteinase as a virulence factor in the pathogenesis of *Candida* infections. **Zbl. Bakt. Hyg. Ser. A.**, v.260, p.539-42, 1985.
- POCKLEY, A.G. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? **Exp. Ver. Mol. Med.**, Cambridge, UK: Cambridge University Press, p 1–21, 2001.
- PUCCIA, R., TRAVASSOS, L.R. 43-Kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, and Jorge Lobo's disease. **J. Clin Microbiol.**, v.29, p.1610-5, 1991.
- PURTILO, D.T., WALSH, G.P., STORRS, E.E, GANNON, C. The immune system of the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn). **Anat. Rec. Philad.**, v.181, p.725-34, 1975.
- RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: A puzzle still unsolved. **J. Med. Vet. Myc.**, v.23, p.324-34, 1985.
- RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **In: Paracoccidioidomycosis.** FRANCO, M.F., LACAZ, C.da S., RESTREPO, A., DEL NEGRO, G. (Eds). Boca Raton, London, CRR Press, 1994, 121-8p.
- RESTREPO, A., BAUMGARDNER, D. J., BAGAGLI, E., et al. Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. **Med. Mycol.**, v.38, p.67-77, 2000.
- RIDLEY, M. **Evolução.** 3 ed. Porto Alegre. Artmed, 2006, 481-4p.
- RHODES, J.C. virulence factors in fungi pathogens. **Microbiol Sci.**, v.5, p.252-4, 1988.
- RICCI, G., MOTA, F.T., WAKAMATSU, A., SERAFIM, R.C., BORRA, R.C., FRANCO, M. Canine paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v.42, p.379-83, 2004.
- RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, v.18, p.571-3, 1962.

- RUCHEL, R. Cleavage of immunoglobulin by pathogenic yeast of the genus *Candida*. **Microbiol. Sci.**, v.3, p.316-9, 1986.
- SALAZAR, M.E., RESTREPO, A. Morphogenesis of the mycelium to yeast transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouradia: J. Med. Vet. Mycol.**, v.22, p.7-11, 1984.
- SALEM-IZACC, S.M., JESUINO, R.S.A., BRITO, W.A., PEREIRA, M., FELIPE M.S.S., SOARES, C.M.A. Protein synthesis patterns of *Paracoccidioides brasiliensis* in stage-specific forms and during cellular differentiation. **J. med. vet. Mycol.**, v.35, p.205-11, 1997.
- SAN-BLAS, G. & VERNET, D. Induction of the synthesis of cell wall  $\alpha$ -1,3-glucan in the yeast like form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9 by fetal calf serum. **Infec. and Immun.**, v.15, p.897-902, 1977.
- SAN BLAS, F., SAN BLAS, G. Bioquímica y dimorfismo en *P. brasiliensis*. In: G. DEL NEGRO, C.S. LACAZ & A.M. FIORILLO (Eds) **Paracoccidioidomycosis**, São Paulo: Sarvier, 1982, 35-8p.
- SANO, A., TANAKA, R., YOKOYAMA, K., FRANCO, M., BAGAGLI, E., MONTENEGRO, M.R., MIKAMI, Y., MIYAJI, M., NISHIMURA, K. Comparison between human and armadillo *Paracoccidioides brasiliensis* by random amplified polymorphic DNA analysis. **Mycopathol.**, v.143, p.165-9, 1999.
- SCHWARTZ, M., COHEN, I.R. Autoimmunity can benedit self-maintenance. **Immunol. Today**, v.21, p.265-8, 2000.
- SHOME, S.K.; BATISTA, A.C. Occurence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife, Brazil. **Rev. Fac. Med. Univ. Fed. Ceará**, v.3, p.90-94, 1963.
- SILVA-VERGARA, M.L., MARTINEZ, R., CAMARGO, Z.P. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* form armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area

- where the fungus was recently isolated from soil. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 193-9, 2000.
- SILVA-VERGARA, M. L.; MARTÍNEZ, R.; CHADU, A.; MADEIRA, M.; FREITAS-SILVA, G. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Med. Mycol.**, v.36, p.37-42, 1998.
- SOLL DR. High-frequency switching in *Candida albicans*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.5, p.183-203, 1992.
- STEENBERGEN, J.N., CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microb. And Infect.**, v.5, p.667-75, 2003.
- STEENBERGEN, J.N., NOSANCHUK, J.D., MALLIARIS, S.D., CASADEVALL, A. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Istioplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. **Infect. and Immun.**, v.72, p.3478-88, 2004.
- TABER, F.W. Contribution on the life story and ecology of the nine-banded armadillo. **J. Mammal.**, v.26, p.211-6, 1945.
- TALMAGE, R.V., BUCHANAN, G.D. The armadillo *Dasypus novemcinctus* – a review of its natural history, ecology, anatomy and reproductive physiology. **Rice Inst. Pamphlet Houston**, v.41, 1954.
- TAYLOR, J. W., JACOBSON, D.J., KROKEN, S., KASUGA, T., GÊISER, D.M., HIBBETT, D.S., FISHER, M.C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Gen. Biol.**, v.31(1), p.21-32, 2000.
- TEIXEIRA, M.M., DE CARVALHO, M.J.A., DANTAS, A.S., FELIPE, M.S.S. The hsp70 gene presents sequence differences among isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.47(14), p.48, 2005.

- TERÇARIOLI, G.R., THEODORO, R.C., BOSCO, S.M.G., REIS, G.M., MACORIS, A.S.G., SIMÕES, L.B., BAGAGLI, E. Ecological study of *Paracoccidides brasiliensis* in soil: culture and molecular detection. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.47(14), p.63, 2005.
- THEODORO, R.C., BOSCO, S.M.G., BAGAGLI, E. yeast Morfology and Transition to the micelial phase in armadillos and clinical *Paracoccidioides brasiliensis* isolates, at different temperatures. In: INTERNATIONAL MEETING ON PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS, 8, 2002. Pirenópolis, Abstract 01-38.
- THEODORO, R.C. CANDEIAS, J.M.G., ARAÚJO Jr., J.P., BOSCO, S.M.G., MACORIS, S.A.G., PADULA Jr., L.O., Franco, M., Bagagli, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Med. Mycol.**, v.43(8), p.725-9, 2005a.
- THEODORO, R.C., BOSCO, S.M.G., SUGIZAKI, M.F.; BAGAGLI, E. Variation on mycelial-to-yeast phase transition and production of conidia in different isolates of *Paracoccidioides brasiliensis* obtained from human, Armadillo and dog. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.47(14), p.45, 2005b.
- THOMAS, P.W., WYCKOFF, E.E., PISHKO, E.J., YU, J.J., KIRKLAND, T.N., COLE, G.T. The hsp60 gene of the human pathogenic fungus *Coccidioides immitis* encodes a T-cell reactive protein. *Gene*, v.199, p.83-91, 1997.
- TSAN, M.F., GAO, B. Heat Shock Protein and Innate Immunity. **Cell. Mol. Immunol.**, v.1, p.274-9, 2004.
- ULRICH, M., CONVIT, J., CENTENO, M., RAPETTI, M. Immunological characteristics of the armadillo, *Dasyus sabanicola*. **Clin. Exp. Immunol.**, v.25, p.170-6, 1976.

- UNTEREINER, W.A, SCOTT, J.A., NAVEAU, F.A., SIGLER, L., BACHEWISH, J., ANGUS, A. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associate Onygenales. **Mycol.**, v.96(4), p.812-21, 2004.
- VARTIVARIAN, S.E. Virulence and nonimmune pathogenic mechanisms of fungi. **Clin. Infect. Dis.**, v.14, p.30-6, 1992.
- VICENTINI, A.P, GESZTESI, J., GESZTESI, J.L., FRANCO, M.F. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect. Immun.**, v.62, p.1465-9, 1994.
- VILLAR, L.A., SALAZAR, M.E., RESTREPO, A. Morphological study of a variant *Paracoccidioides brasiliensis* that exists en the yeast form at room temperature. **J. med. Vet. Mycol.**, v.26, p.269-76, 1988.
- WANKE, B. & LONDERO, A. T. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis Infection. In: **Paracoccidioidomycosis**. FRANCO, M.F., LACAZ, C.da S., RESTREPO, A., DEL NEGRO, G. (Eds). Boca Raton, London, CRR Press, 1994, cap.7.
- YOST, H.J., LINDQUIST, S. RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis. **Cell**, v.45, p.185-93, 1986.
- YOST, H.J., LINDQUIST, S. Translation of unspliced transcripts after heat shock. **Science**, v.242, p.1544-8, 1988.
- YOST, H.J., LINDQUIST, S Heat Shock Proteins Affect RNA Processing during the Heat Shock Response of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v.11, p.1062-8, 1991.
- ZUGEL, U., KAUFMANN, S.H. Immune response against heat-shock proteins in infectious diseases. **Immunobiol.**, v. 201, p. 22-35, 1999a.

ZUGEL, U., KAUFMANN, S.H. Role of Heat Shock Proteins in Protection from and Pathogenesis of Infectious Diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.12, p.19-39, 1999b.