

# ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ADESINAS ENVOLVIDAS NA INTERAÇÃO DE *Paracoccidioides brasiliensis* COM CÉLULAS EPITELIAIS.

Paula Bonni Dosualdo, Maria José Soares Mendes Giannini, Fabiana Cristina Donofrio, Julhiany de Fátima da Silva, Patrícia Ferrari Andreotti – Microbiologia – Farmácia-Bioquímica – Departamento de Análises Clínicas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus de Araraquara.

*Paracoccidioides brasiliensis* é um importante patógeno humano com habilidade para infectar diversos sítios anatômicos, causando assim diferentes manifestações clínicas da paracoccidioidomicose (PCM) e, portanto, este fungo deve ter desenvolvido mecanismos que o capacitam a aderir, extravasar e invadir barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro. A PCM é uma doença de início pulmonar, e a aquisição do fungo se faz, sobretudo, por via respiratória com a inalação de conídios sésseis da forma filamentosa de *P. brasiliensis*.

A complexidade de interações entre *P. brasiliensis* e o hospedeiro humano sugere que o fungo codifica ligantes (adesinas) que permitem sua adaptação à diversidade de sítios no hospedeiro, tendo capacidade de invadir células epiteliais de linhagens humanas e animais, e de aderir a componentes da matriz extracelular tais como fibrinogênio, laminina, colágeno ou fibronectina. A glicoproteína de 43 kDa de *P. brasiliensis* tem sido implicada como ligante para laminina e fibronectina, além de outras adesinas com massa molecular de 30 kDa, que se liga a laminina, e dois polipeptídeos com massas moleculares de 19 e 32 kDa capazes de interagir com proteínas da MEC como laminina, fibronectina e fibrinogênio. Ainda, a proteína gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase (GAPDH), recombinante de *P. brasiliensis*, foi capaz de se ligar a laminina, colágeno I e fibronectina e o tratamento de formas leveduriformes de *P. brasiliensis* com anti-GAPDH e de pneumócitos com GAPDH recombinante promoveu a inibição da infecção do fungo às células epiteliais. Por outro lado, uma serino-tiol proteinase foi identificada com capacidade de clivar componentes da membrana basal da matriz extracelular, incluindo a laminina, fibronectina, colágeno tipo IV e proteoglicanas, e estudos demonstraram que diferentes isolados de *P. brasiliensis* produzem proteinases e fosfolipases. Assim, neste estudo pretendeu-se isolar e caracterizar as proteínas de *P. brasiliensis* relacionadas à adesão de proteínas da matriz extracelular, bem como, verificar sua capacidade de clivar estes componentes.

Para a realização deste estudo foram preparados extratos de filtrado de cultura do isolado 18 de *P. brasiliensis* fase “L” procedente da micoteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As proteínas presentes nestes extratos foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, SDS-PAGE, e após fracionamento, as proteínas de interesse foram purificadas por cromatografia de exclusão e de afinidade, e submetidas à eletroforese para a determinação dos seus respectivos pontos isoelétricos. Essas proteínas (adesinas) foram caracterizadas como ligantes da matriz extracelular (laminina, fibronectina, colágenos I e IV) por *imunoblot*. As adesinas caracterizadas como ligantes de componentes de matriz extracelular foram avaliadas quanto à atividade proteolítica quando colocadas em contato com quantidades equivalentes de laminina, fibronectina, colágeno I e IV em pH 7.0 a 37°C por 1 hora e para tanto, as frações tiveram sua concentração protéica determinada pelo método Bradford e a clivagem destes foi avaliada por SDS-PAGE.

Os extratos do isolado 18 de *P. brasiliensis* mostraram proteínas com perfil eletroforético variando de 20 a 98 kDa. Neste estudo foram caracterizadas, como adesinas, uma proteína de 30 kDa de pI 4,9 capaz de se ligar a laminina e uma de 57 kDa de pI 5,2 capaz de se ligar à fibronectina e ao colágeno tipo IV. Proteínas ligantes da laminina podem contribuir para a patogênese da infecção por mediar a adesão aos ligantes do hospedeiro e retenção do fungo nos tecidos. Com base em nossos resultados, podemos concluir que *P. brasiliensis* utiliza estas proteínas no processo de adesão às células hospedeiras e provavelmente tenha papel na virulência. Quanto à capacidade proteolítica, nas condições testadas, foi verificado que a fração contendo a proteína de 30 kDa foi capaz de clivar a laminina e a gp43 foi capaz de clivar colágeno tipo I.

Portanto, o estudo de componentes deste fungo pode contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos de aderência e seu envolvimento na virulência.

## Referências Bibliográficas

ANDREOTTI, P.F., MONTEIRO DA SILVA, J.L., BAILÃO, A.M., SOARES, C.M., BENARD, G., SOARES, C.P., MENDES-GIANNINI, M.J. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes infect.** v.5, p.875-81, 2005.

ASSIS, C.M., GAMBALE, W., PAULA, C.R. Production of proteinase and phospholipase by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v.146, p.13-7, 1999.

BARBOSA, M. S.; BAO, S. N.; ANDREOTTI, P. F.; DE FARIA, F. P.; FELIPE, M. S.; DOS SANTOS FEITOSA, L.; MENDES-GIANNINI, M. J.; SOARES, C. M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 382-389, 2006.

CARMONA, A.K.; PUCCIA, R.; OLIVEIRA, M.C.F.; RODRIGUES, E.G.; JULIANO, L. Characterization of an exocellular serine-thiol proteinase activity in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Biochem. J.**, v. 309, p. 209-14, 1995.

FRANCO, M. F. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p. 548, 1987.

FURTADO, G.C.; CAO, Y.; JOINER, K.A. Laminin on *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to the beta 1 integrin receptor alpha 6 beta 1 on human foreskin fibroblasts and chinese hamster ovary cells. **Infect Immun.**, v. 60, p. 4925-4931, 1992.

GONZALEZ, A.; GOMEZ, B. L.; DIEZ, S.; HERNANDEZ, O.; RESTREPO, A.; HAMILTON, A. J.; CANO, L. E. Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* proteins with capacity to bind to extracellular matrix proteins. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2486-2495, 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-5, 1970.

MC MAHON, J.P., WHEAT, J., SOBEL, M.E., PASULA, R., DOWNING, J. F., MARTIN, W. J. Murine Laminin binds to *Histoplasma capsulatum*. A possible mechanism of dissemination. **J. Clin. Inv.**, v. 96, p. 1010-1017, 1995.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; TAYLOR, M. L.; BOUCHARA, J. B.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G.; ESCALANTE, E. D.; HANNA, S.A.; LENZI, H. L.; MACHADO, M. P.; MIYAJI, M.; MONTEIRO DA SILVA, J. L.; MOTA, E. M.; RESTREPO, A.; RESTREPO, S.; TRONCHIN, G.; VINCENZI, L.R.; XIDIEH, C. F.; ZENTENO, E. Pathogenesis II: Fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Med. Mycol.**, v.38, p. 113-23, 2000.

PUCCIA, R.; CARMONA, A.K.; GESZTESI, J.L.; JULIANO, L.; TRAVASSOS, L.R. Exocellular proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis*: cleavage of components associated with the basement membrane. **Med. Mycol.** V.36, p.354-8, 1998.

OFEK, I.; KAHANE, I.; SHARON, N. Toward anti-adhesion therapy for microbial diseases. **Trends in Microbiol.**, v. 4, p. 297-299, 1996.

O'FARRELL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.** v.250, p. 4007-21, 1975.

SIDRIM, J. J. C.; OLIVEIRA, F. G. M. Micoses profundas: paracoccidioidomicose. In: SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 14, p. 154-156.

**Bolsa:** CNPq/PIBIC