

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Estudo sobre a ecologia e origem da virulência de *Paracoccidioides brasiliensis* - caracterização de sua interação com *Acanthamoeba castellanii*

Diogo Magnabosco de Almeida Gomes

Brasília

2014

DIOGO MAGNABOSCO DE ALMEIDA GOMES

Estudo sobre a ecologia e origem da virulência de *Paracoccidioides brasiliensis* - caracterização de sua interação com *Acanthamoeba castellanii*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, da Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientadora: Dra. Ildinete Silva Pereira

Co-orientadora: Dra. Patrícia Albuquerque de Andrade

Brasília

2014

Agradecimentos

À minha mãe, pai e irmão por todo apoio que sempre me deram em todos os momentos que precisei. Vocês são as pessoas mais importantes para mim. Vocês ajudaram a moldar meu caráter. Nenhuma das conquistas que tenho hoje seriam possíveis sem vocês e por isso serei eternamente grato.

À minha namorada Larissa por todo amor, carinho e compreensão que tem me dado. Obrigado por aparecer em minha vida. Sua presença foi fundamental para me ajudar a seguir em frente nos momentos mais difíceis e para superar os desafios que apareceram em meu caminho. Obrigado por todo aprendizado que tivemos juntos.

Às minhas tias Marlene, Maria Elisa e Antônia por todo apoio e ajuda que me deram desde o momento que cheguei em Brasília. Obrigado por todo carinho e por estarem presentes nos momentos que precisei.

Às minhas orientadoras Ildinete e Patrícia pela confiança depositada em mim e por terem me aceitado em nosso laboratório me dando a oportunidade de fazer parte de uma das melhores equipes que pude encontrar. Obrigado por toda ajuda e ensinamentos que me proporcionaram.

Aos meus segundos orientadores André e Lorena por toda ajuda e ensinamentos que me deram. Obrigado por todas as contribuições com novas idéias, experimentos e por terem contribuído tanto com esse trabalho.

Aos meus grandes amigos Nathália Vilela, Nathalia Vasconcelos, Fernanda Ramos, Fernanda Guilhelmeli, Isadora Freitas, Pedro Saavedra e Rafaela Fontenele. Ter conhecido pessoas tão legais foi um dos motivos por eu escolher permanecer em Brasília. Vocês são minha segunda família e tornaram minha jornada muito mais feliz e agradável.

Aos meus colegas de laboratório, que hoje posso dizer que são meus amigos. Obrigado por todos momentos de descontração e por terem contribuído significativamente com novas idéias e ajuda nos experimentos.

Aos colegas do Lab 4 por toda ajuda e pela boa convivência tornando o ambiente de trabalho muito mais agradável.

À Fátima, Ivonildes e todos os outros funcionários que ajudaram na organização e limpeza do laboratório.

Aos colegas do laboratório de microscopia, principalmente Ingrid, pela ajuda com o processamento e obtenção das imagens de MET.

Aos professores que compõem a banca, por terem disponibilizado o tempo para avaliar este trabalho.

Ao CNPq e FAP-DF pelo apoio financeiro.

Sumário

Agradecimentos	3
Sumário	5
Índice de figuras	7
Abreviaturas	8
Resumo	11
Abstract	12
1. Introdução	13
1.1) <i>P. brasiliensis</i> e a paracoccidioidomicose.....	13
1.2) Ecologia de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	16
1.3) Origem e manutenção da virulência em <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e outros fungos patogênicos	21
1.4) <i>Acanthamoeba castellanii</i> e outros organismos como modelo para o estudo de fungos patogênicos.	24
2. Objetivos.....	28
2.1) Objetivo geral.....	28
2.2) Objetivos específicos.....	28
3. Materiais e Métodos	29
3.1) Meios de cultura	29
3.1.1) Fava-Neto.....	29
3.1.2) PYG	29
3.1.3) BHI (Brain Heart Infusion).....	29
3.2) Corantes.....	30
3.2.1) Solução de Azul de tripano (0,4%).....	30
3.2.2) Uvitex 2B.....	30
3.2.3) CMFDA.....	30
3.2.4) DID-DS.....	30
3.3) Tampão para preparo de amostras para microscopia eletrônica	30
3.3.1) Tampão cacodilato de sódio	30
3.4) Solução de lavagem das células	31
3.4.1) Tampão fosfato (PBS) 10X.....	31

3.5) Linhagens celulares e Manutenção	31
3.5.1) <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	31
3.5.2) <i>Acanthamoeba castellanii</i>	31
3.6) Microscopia confocal.....	31
3.7) Microscopia eletrônica de transmissão.....	32
3.8) Cinética da internalização de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> pela ameba <i>A. castellanii</i>	32
3.9) Ensaio de viabilidade de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	33
3.10) Ensaio de viabilidade de <i>P. brasiliensis</i> quando na interação com <i>A. castelani</i> , empregando diferentes metodologias	33
3.10.1) Determinação de unidades formadoras de colônia – CFU de acordo com Singer-Vermes <i>et al.</i> (1992).....	33
3.10.2) Ensaio de viabilidade empregando o método XTT.....	34
3.10.3) Ensaio de viabilidade empregando a coloração com Azul de tripano.....	34
3.11) Análise do efeito na virulência fúngica pela passagem seriada de <i>P. brasiliensis</i> em <i>A. castellanii</i>	35
3.12) Efeito de <i>A. castellanii</i> na filamentação de <i>P. brasiliensis</i>	35
3.12.1) Extração de lipídios de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	35
3.12.2) Incubação de <i>P. brasiliensis</i> com fração polar da extração de lipídios de <i>A.</i> <i>castellanii</i>	36
4. Resultados e Discussão	37
4.1) Interação entre <i>A. castellanii</i> e <i>P. brasiliensis</i>	37
4.2) Cinética da internalização de <i>P. brasiliensis</i> por <i>A. castellanii</i>	39
4.3) Análise da viabilidade de <i>P. brasiliensis</i> e <i>A. castellanii</i> após co-incubação	42
4.4) <i>A. castellanii</i> interfere na filamentação de <i>P. brasiliensis</i>	45
4.5) Efeito sobre a virulência de <i>P. brasiliensis</i> após passagem seriada em <i>A. castellanii</i>	48
5. Conclusões e Perspectivas	51
6. Referências Bibliográficas	53

Índice de figuras

Figura 1. Distribuição geográfica do gênero <i>Paracoccidioides</i> e <i>L. loboi</i>	17
Figura 2. Ciclo de vida hipotético de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	19
Figura 3. Microscopia confocal da interação entre <i>A. castellanii</i> e <i>P. brasiliensis</i>	37
Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão da interação entre <i>A. castellanii</i> e <i>P. brasiliensis</i>	38
Figura 5. Viabilidade de <i>P. brasiliensis</i> após agitação em vortex com pérolas de vidro.....	39
Figura 6. Cinética da internalização de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> pela ameba <i>A. castellanii</i>	40
Figura 7. Microscopia de fluorescência da interação entre <i>A. castellanii</i> e <i>P. brasiliensis</i>	41
Figura 8. Porcentagem de mortalidade de Amebas (Ac) após co-cultivo com <i>P. brasiliensis</i> (Pb).....	42
Figura 9. Viabilidade de <i>P. brasiliensis</i> após coincubação com <i>A. Castellanii</i>	44
Figura 10. Inibição da filamentação de <i>P. brasiliensis</i> pela coincubação com <i>A. castelani</i>	46
Figura 11. Curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> infectada com <i>P. brasiliensis</i>	49

Abreviaturas

°C - Graus Celsius

Ac – *Acanthamoeba castellanii*

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

cAMP - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

CFU - Unidades Formadoras de Colônia

cDNA – DNA complementar

CT - Ciclo limiar

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido Dexorribonucléico

DNase - Desoxirribonuclease I

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DTT - Ditioneitol

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

g – Grama

gp – Glicoproteína

GLS - Glicosfingolipídios

h – Hora

H₃BO₃ – Ácido bórico

HCL - Ácido clorídrico

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

IFN- γ – Interferon-gama

IL-6 – Interleucina – 6

IL-12 – Interleucina – 12

IL-10 – Interleucina – 10

KCl – Cloreto de potássio

KH₂PO₄ – Fosfato de potássio

kV - Quilovolts

M - Molar

MBP – Proteína ligadora de manose

mg – Miligrama

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

MgSO₄ - Sulfato de magnésio

min - Minutos

mL - Mililitro

mM – Milimolar

MBP – Proteína ligadora de manose

NaCl – Cloreto de Sódio

Na₂HPO₄ - Fosfato dissódico

nm - Nanometro

NaN₃ - Azida de sódio

NO - Óxido nítrico

Pb – *Paracoccidioides brasiliensis*

PBS - Tampão Salina Fosfato

PCM – Paracoccidioidomicose

p/v – Peso:volume

pH - Potencial hidrogeniônico

RNA – Ácido Ribonucléico

RNase - Ribonuclease

Rpm – Rotações por minuto

TNF- α - Fator de necrose tumoral-alfa

v/v – Volume:volume

U – Unidade

XTT - 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2*H*-Tetrazolium-5-Carboxanilide

μg - Micrograma

μL - Microlitro

μM – Micromolar

μm - Micrômetro

Resumo

Paracoccidioides brasiliensis é um parasita intracelular facultativo que apresenta-se sob a forma de micélio à temperatura ambiente e se diferencia para forma de levedura quando submetido à temperatura de 37°C ou durante a invasão aos tecidos de hospedeiros. *P. brasiliensis* não necessita do hospedeiro mamífero para completar seu ciclo biológico. Apesar disso, o fungo é capaz de sobreviver e se replicar nos tecidos do hospedeiro com o estabelecimento da doença. Em face desse paradoxo, questiona-se porque tais estratégias de sobrevivência se originaram e foram mantidas pela evolução nesse organismo. A hipótese proposta para vários fungos patogênicos é que fatores de virulência possam ter se desenvolvido como uma resposta à interação com predadores presentes no ambiente. Tais estudos utilizaram a ameba de solo *Acanthamoeba castellanii*, e mostraram quão expressivas são as similaridades nas estratégias fagocitárias de amebas e macrófagos. O objetivo geral desse trabalho é analisar a interação entre *P. brasiliensis* e *A. castellanii*, identificando os principais efeitos dessa interação na viabilidade dos organismos e na virulência desse fungo. Avaliando a interação entre *P. brasiliensis* e *A. castellanii* podemos constatar que a ameba é capaz de internalizar células do fungo. A cinética de fagocitose nos mostra que a porcentagem de amebas com fungos internalizados aumenta até 2 h após o início da coincubação e se mantém até 6 h. Analisando resultados da mortalidade de *A. castellanii* e *P. brasiliensis* quando coincubados por 24h observamos que a ameba é capaz de sobreviver e eliminar o fungo. Porém acreditamos que o fungo possa aumentar sua virulência quando recuperado após a coincubação com ameba, o que corrobora com resultados de testes similares feitos em macrófagos e nos dão fortes indícios de que esses protozoários estão intimamente ligados com o aparecimento de fatores de virulência em *P. brasiliensis*.

Palavras Chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Acanthamoeba castellanii*, ecologia, interação, virulência.

Abstract

Paracoccidioides brasiliensis is a facultative intracellular parasite and presents itself in the form of mycelium at room temperature and as yeast at 37°C or during invasion of host tissues. *P. brasiliensis* does not require a mammalian host to complete its life cycle. Nonetheless, the fungus is able to survive and replicate in the host tissues with the development of the disease. In view of this paradox, it is questioned why such survival strategies were originated and maintained in that organism. To try to answer this question Steenbergen *et al* (2001) and Casadevall *et al* (2003) created a hypothesis that virulence factors may have developed in some virulent fungi in response to interaction with predators in the environment. Such studies used the soil amoeba *Acanthamoeba castellanii*, and showed how significant are the similarities in the phagocytic strategies from amoebae and macrophages. The aim of this study is to analyze the interaction between *P. brasiliensis* and *A. castellanii*, identifying the main effects of this interaction in the viability of these two organisms and virulence of this fungus. Evaluating the interaction between *P. brasiliensis* and *A. castellanii* we observed that amoeba is capable of internalizing fungal cells. The kinetics of phagocytosis shows that the percentage of amoeba with internalized fungi increases within 2h after the start of coincubation and keeps up to 6h. Analyzing mortality results of *A. castellanii* and *P. brasiliensis* after coincubation for 24h we observed that amoeba is capable of surviving and kill the fungus. However, we believe that the fungus can increase its virulence when recovered after coincubation with amoebae, in agreement with results of similar tests on macrophages and gives us strong evidence that this protozoa is closely related with the emergence of virulence factors in *P. brasiliensis*.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Acanthamoeba castellanii*, ecology, interaction, virulence.

1. Introdução

1.1) *P. brasiliensis* e a paracoccidiodomicose

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo dimórfico e agente causador da paracoccidiodomicose (PCM), uma das micoses sistêmicas mais frequentes na América Latina (Brummer *et al.*, 1993; Restrepo *et al.*, 2001). O fungo é encontrado na forma leveduriforme em culturas à 37°C e quando infecta tecidos de seus hospedeiros mamíferos, mas apresenta-se na forma de micélio à temperatura ambiente. Na forma de levedura é encontrado em tamanhos variando entre 4 e 30 µm e apresenta um formato ovalado. As leveduras do fungo são frequentemente encontradas cercadas de brotamentos de células filhas em sua periferia, resultando em uma estrutura parecida com uma roda de leme. Essa é uma de suas principais características, o que resulta no aparecimento de uma grande quantidade de grumos quando o fungo é cultivado em meio líquido (Brummer *et al.*, 1993). Apesar de ser capaz de completar seu ciclo de vida no solo, presume-se que a forma miceliana no seu ambiente natural produza conídios, os quais agem como propágulos infecciosos, que ao serem inalados chegam aos pulmões, onde passam por uma mudança dimórfica para a forma de levedura estabelecendo a infecção (Brummer *et al.*, 1989). Nos tecidos do hospedeiro *P. brasiliensis* é ingerido por macrófagos e pode se replicar no interior dessas células. A transição dimórfica é fundamental para o estabelecimento da infecção e depende basicamente da temperatura, sendo facilmente reproduzida *in vitro*, a partir da simples mudança na temperatura de cultivo do microrganismo. Ainda se sabe pouco sobre o controle das mudanças morfológicas nas transições dimórficas do fungo, mas sabe-se que cAMP possui um papel importante já que a presença de cAMP exógeno inibe a transição de levedura para micélio (Brummer *et al.*, 1989; Borges-Walmsley e Walmsley, 2000). As mudanças morfológicas quando *P. brasiliensis* assume a forma de levedura envolvem um aumento na quantidade de quitina, mudanças na membrana celular envolvendo diferenças nos glicosíngolipídios (GSL) e aumento da porcentagem de α -1,3-glicana na parede celular. Uma das mudanças no fungo durante sua transição dimórfica envolvem a alteração de β -1,3-glicana para α -1,3-glicana. Isolados mais virulentos possuem uma maior porcentagem de α -1,3-glicana em sua parede celular (Borges-Walmsley *et al.*, 2002).

A paracoccidiodomicose é uma doença granulomatosa crônica e suas áreas de maior incidência são Brasil (80% dos casos), Venezuela e Colômbia (McEwen *et al.*, 1995; Restrepo *et al.*, 2001). No Brasil ocorrem aproximadamente 200 mortes por ano em virtude da PCM, sendo os estados mais afetados São Paulo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso e Rondônia (Coutinho *et al.*, 2002; Vieira *et al.*, 2014). Essa micose acomete principalmente trabalhadores rurais ou pessoas que lidam diretamente com a terra. No entanto, a PCM tem se tornado uma infecção emergente em outras regiões em decorrência de perturbações ambientais e também tem sido descrita como uma infecção oportunista em portadores de HIV (Morejon *et al.*, 2009; Ameen *et al.*, 2010). Em áreas endêmicas a ocorrência é de 3 casos para cada 100.000 habitantes. Entretanto, a importância da PCM é subestimada devido ao fato dela, muitas vezes, ser assintomática. Dos aproximadamente 10 milhões de indivíduos infectados a doença só se manifesta em 2% dos casos. Apesar disso, essa doença demanda altos custos econômicos e sociais. Cerca de 50% dos casos de morte por micoses sistêmicas no Brasil no período de 1996 e 2006 foram decorrentes da PCM, além disso ela deixa frequentes sequelas secundárias que resultam na morbidade do paciente (McEwen *et al.*, 1995; Barrozo *et al.*, 2009; Prado *et al.*, 2009). A principal forma de diagnosticar a PCM ainda é feita por técnicas micológicas de microscopia e cultura. Entretanto existem técnicas mais avançadas como a detecção do antígeno gp43. Esse antígeno é uma glicoproteína secretada pelo fungo que fica armazenado em grandes vacúolos citoplasmáticos e sua secreção é realizada em regiões específicas da parede celular (Straus *et al.*, 1996; Puccia *et al.*, 2008).

A maior taxa de incidência da PCM encontra-se entre indivíduos adultos do sexo masculino. Em um estudo realizado por Restrepo *et al.* (1997), dos 5.500 pacientes examinados 5.045 eram do sexo masculino enquanto 455 eram do sexo feminino gerando uma proporção de Homem/Mulher de 11:1. Acreditava-se que essa proporção era devida a um grau de exposição maior ao fungo em indivíduos do sexo masculino, entretanto estudos realizados com crianças mostraram que antes de atingida a puberdade a incidência era próxima para ambos os sexos. Assim, em estudos mais recentes a maior taxa de incidência em indivíduos masculinos vem sendo relacionada a produção de hormônios diferenciada em homens e mulheres (San-Blas *et al.*, 2002; Shankar *et al.*, 2011). Testes *in vitro* mostraram que hormônios femininos como estrógeno foram capazes de inibir significativamente a transição do fungo de micélio para levedura e conídio para levedura mostrando que a presença desse esteróide pode de fato influenciar *P. brasiliensis*, uma vez que atua em uma etapa crucial do estabelecimento da doença (Restrepo *et al.*, 1984; Shankar *et al.*, 2011). Apesar do hormônio

feminino ter grande influência sobre a transição dimórfica de *P. brasiliensis*, outros fatores contribuem para uma maior incidência da PCM em indivíduos do sexo masculino. Estudos mostram que o sistema imune do hospedeiro pode afetar o desenvolvimento da doença. Células retiradas de camundongos do sexo feminino infectados com *P. brasiliensis* produzem níveis maiores de IL-12, IFN- γ e TNF- α , que são citocinas importantes na resistência à infecção. Já células retiradas de camundongos do sexo masculino infectados com o fungo produzem níveis maiores de IL-10, citocina que pode atrapalhar o desenvolvimento de uma resposta imune adequada contra *P. brasiliensis* (Pinzan *et al.*, 2010).

A PCM pode se apresentar de duas formas distintas: Aguda ou subaguda (tipo juvenil) e crônica (tipo adulto). Ambos os casos, quando não tratados, podem deixar lesões de pele permanentes ou até levar a morte. A forma aguda representa apenas 3 a 5% de todos os casos, atingindo na sua maioria crianças ou adultos jovens e é também a mais severa. Pacientes infectados com essa forma da doença podem apresentar hipertrofia de órgãos do sistema reticuloendotelial e disfunções na medula óssea. Já a forma crônica representa mais de 90% dos casos e acomete principalmente adultos do sexo masculino. Na maioria dos pacientes o pulmão é o órgão mais afetado e se não houver tratamento podem aparecer lesões na mucosa nasal e oral, pele, linfonodos e glândula adrenal. Normalmente a PCM é curada através da fibrose do tecido afetado, o que afeta permanentemente o bem estar do paciente (Franco, 1987; Brummer *et al.*, 1993; Borges-Walmsley *et al.*, 2002).

A principal estratégia do hospedeiro para conter a proliferação do *P. brasiliensis* é a indução da formação de granulomas, sendo essa uma das principais características da doença. Em pacientes com uma forma menos severa da doença a resposta imune induz a formação de granulomas mais densos e compactos associados com poucas células fúngicas. Já pacientes com a forma mais severa tendem a formar granulomas menos compactos e associados com um grande número de células fúngicas viáveis. A resposta imune do hospedeiro com PCM também pode ser caracterizada pela produção de citocinas do tipo 1 (IFN- γ , IL-12), induzindo macrófagos a produzir óxido nítrico (NO), que atua como um importante agente microbicida contra *P. brasiliensis* (Bocca *et al.*, 1998; Calich *et al.*, 1998; Borges-Walmsley *et al.*, 2002). Entretanto, indivíduos susceptíveis a PCM frequentemente possuem uma baixa produção de IL-12 e IFN- γ que pode estar relacionada com o aumento na produção de IL-10, além disso evidências mostram que a produção de IL-10 pode afetar negativamente a produção de óxido nítrico induzido por IFN- γ , reduzindo assim, a atividade fungicida de fagócitos como macrófagos (Costa *et al.*, 2013).

Diferente de espécies de fungos geneticamente próximas ainda não foi observado um estágio sexual em *P. brasiliensis*. Entretanto estudos moleculares mostraram eventos de recombinação em populações isoladas do gênero *Paracoccidioides* sugerindo a existência de um possível ciclo sexual (Gomes-Rezende *et al.*, 2012). Além disso, estudos de genômica comparativa com outros fungos dimórficos demonstraram a presença de genes conservados envolvidos na reprodução sexuada, mas a forma teleomórfica desse fungo ainda é desconhecida o que dificulta sua classificação. Assim, sua classificação vem sendo baseada em estudos de comparação filogenética de sequenciamento do DNA que codifica para subunidade maior do RNA ribossômico (26S). Atualmente o fungo pode ser classificado como um Ascomiceto (filo Ascomycota) da ordem Onygenales e família Ajellomycetaceae (Leclerc *et al.*, 1994;Teixeira Mde *et al.*, 2013).

Diferente do que se acreditava *P. brasiliensis* não é considerado uma espécie clonal. Estudos moleculares demonstraram extensas variabilidades genéticas entre seus diferentes isolados, além disso é conhecida a grande variabilidade na virulência desses isolados (Singer-Vermes *et al.*, 1989;Soares *et al.*, 1995;Matute *et al.*, 2006). Hoje é reconhecido que o gênero *Paracoccidioides* possui quatro linhagens filogenéticas distintas: S1, PS2 e PS3 do complexo *P. brasiliensis* e uma nova espécie denominada *Paracoccidioides lutzii* originalmente chamada de Pb01-like. Essas linhagens variam em virulência, adaptação a cultura *in vitro* e apresentam diferentes respostas imunes de seus hospedeiros (Desjardins *et al.*, 2011). O isolado utilizado nesse estudo (Pb18) pertence ao grupo genético majoritário S1 que é encontrado principalmente no Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai, Peru e Venezuela. A linhagem PS2 é encontradas no Brasil e um na Venezuela enquanto a linhagem PS3 foi considerada clonal e restrita a Colômbia. Já a mais nova espécie *P. lutzii* é encontrada predominantemente na região centro-oeste do Brasil (Figura 1) (Richini-Pereira *et al.*, 2009;Desjardins *et al.*, 2011;Theodoro *et al.*, 2012).

1.2) Ecologia de *Paracoccidioides brasiliensis*

Desde a descoberta de *P. brasiliensis* e a primeira descrição da PCM foram feitas (1908), muitos avanços sobre a biologia do fungo foram feitos. Entretanto, quando se trata da ecologia e hábitat do fungo, a despeito de significantes progressos obtidos nos últimos anos, ainda existem muitas questões em aberto para se determinar de maneira clara o seu nicho ecológico. Existem vários indícios de que esse fungo apresente uma fase saprofítica no solo

e/ou em vegetais, como é o caso de vários outros fungos de interesse médico (Restrepo *et al.*, 2001;Tercarioli *et al.*, 2007). Além do hospedeiro humano, nas últimas décadas *P. brasiliensis* tem sido reprodutivamente isolado em diferentes espécies de animais, dentre eles o mais encontrado é o *Dasybus novemcinctus* (tatu), sendo esse mais um indício que este fungo provavelmente habita o solo de regiões endêmicas (Bagagli *et al.*, 1998). Entretanto *P. brasiliensis* já foi detectado molecularmente em várias outras espécies como o *Procyon cancrivorus* (Mão-pelada), *Cavia aperea* (Preá), *Sphiggurus spinosus* (Porco espinho), *Galictis vittata* (Furão-grande) e *Eira barbara* (Irara) (Restrepo *et al.*, 2001;Tercarioli *et al.*, 2007;Richini-Pereira *et al.*, 2008).

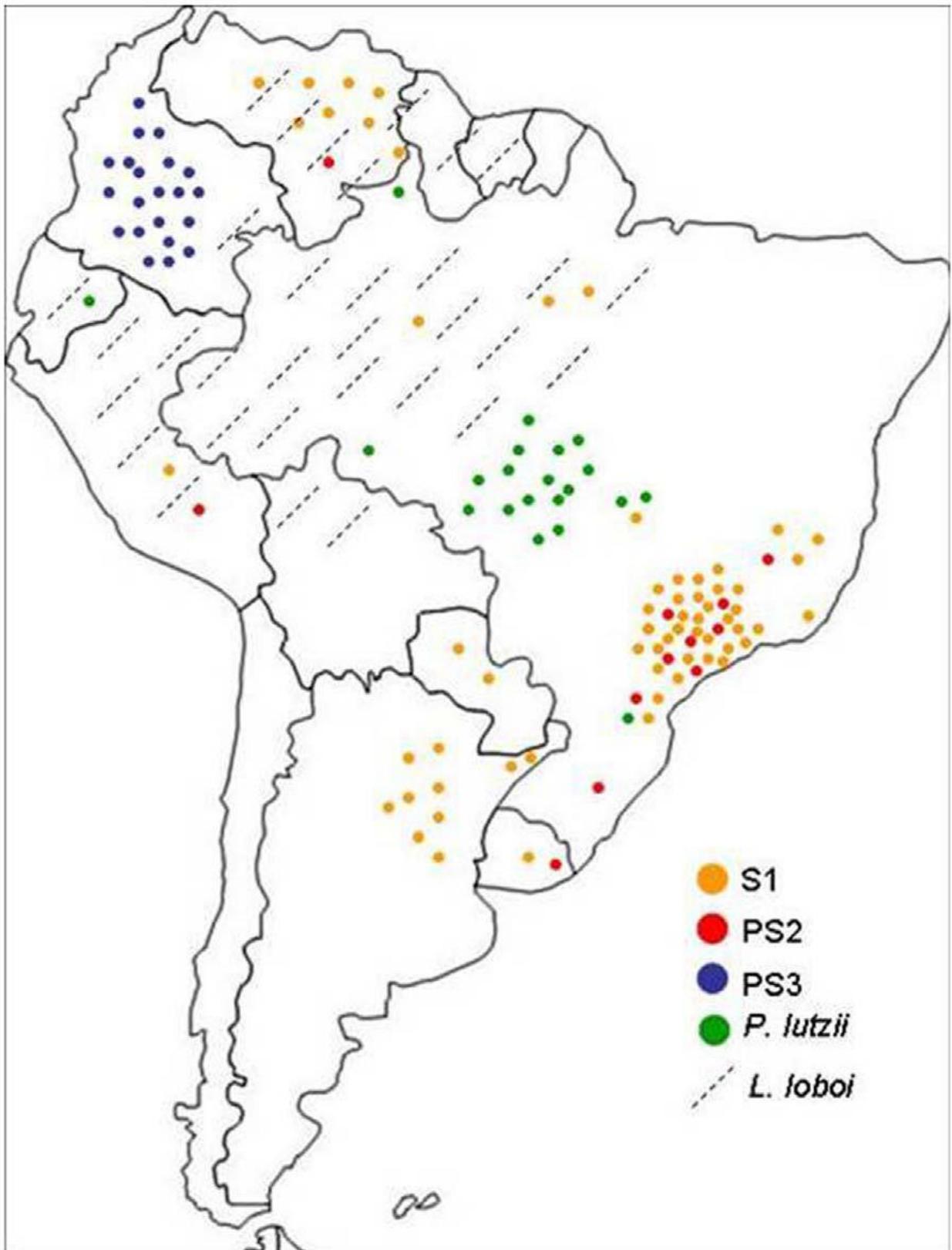
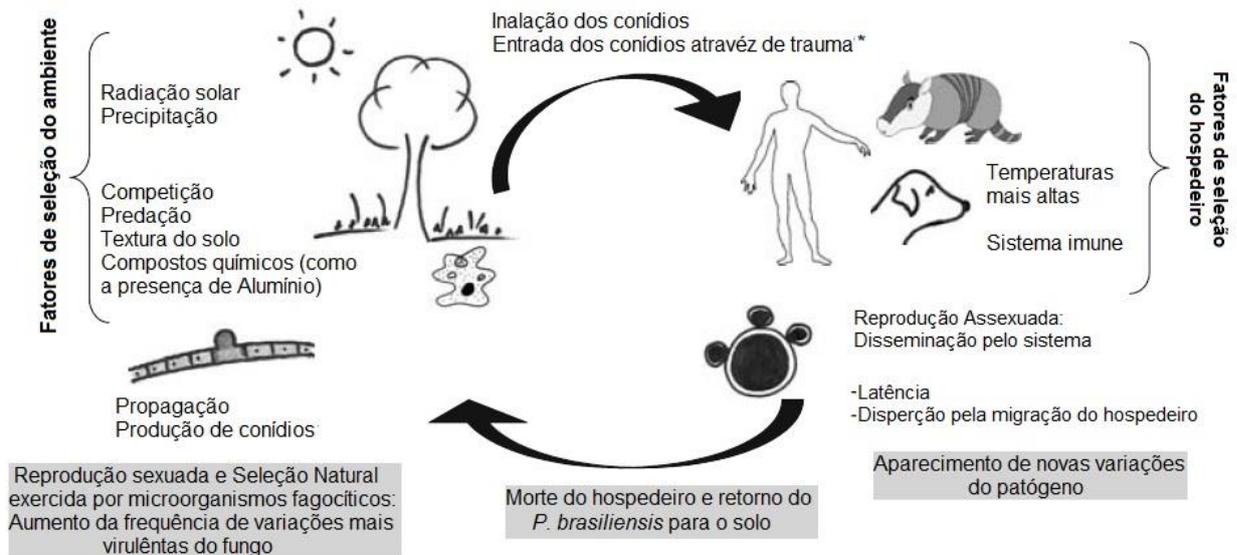


Figura 1. **Distribuição geográfica do gênero *Paracoccidioides* e *L. loboi*.** Atual distribuição das linhagens S1, PS2, PS3, *P. lutzii* e *L. loboi* (espécie próxima ao gênero *Paracoccidioides*) na América do Sul. Adaptado de Theodoro *et al* (2012).

D. novemcinctus é um mamífero encontrado na América do sul que constrói tocas subterrâneas e possui uma temperatura corporal variando entre 32,7°C e 35,3°C (Purtilo *et al.*, 1975;Boily, 2002). Vários isolados já foram encontrados em tatus, com características bastante semelhantes a isolados clínicos sugerindo que os mesmos infectam humanos e outros animais (Franco *et al.*, 2000). O estudo molecular de isolados de *P. brasiliensis* encontrados em tatus pode ser de extrema importância para melhor compreendermos a ecologia e evolução desse patógeno. Além disso, estudos sobre o estilo de vida desse animal pode nos dar pistas sobre seu papel como hospedeiros no ciclo epidemiológico do fungo (Purtilo *et al.*, 1975;Corredor *et al.*, 1999;Silva-Vergara *et al.*, 2000;Boily, 2002). Vários trabalhos sugerem que o contato constante do tatu com *P. brasiliensis* no solo faz com que ele seja infectado repetidas vezes, o que pode ser útil no mapeamento das áreas de maior risco de infecção (Sano *et al.*, 1999). Esses animais tem o hábito de viver próximos a suas tocas e não é comum que percorram longas distâncias para procurar alimento ou para reproduzir. Assim, tatus infectados podem indicar que o fungo é encontrado nas proximidades (Bagagli *et al.*, 2003).

Tatus infectados são comumente encontrados em áreas com sombra, perto de rios e com solos tanto argilosos quanto arenosos, indicando que a umidade é um fator importante para a ocorrência do fungo, enquanto que o tipo de solo parece não ter grande influência, apesar da infecção em humanos ser mais prevalente em solos argilosos (Simoes *et al.*, 2004;Bagagli *et al.*, 2008). Diversos estudos foram feitos para analisar como *P. brasiliensis* interage com fatores abióticos no solo quando em sua forma de micélio. Foi observado que o fungo pode crescer em ambos os tipos de solo (argiloso e arenoso) e que a umidade é realmente um fator limitante para sua sobrevivência. Quando a umidade é alta o fungo apresenta boas taxas de crescimento, com uma umidade média apresenta taxas moderadas de crescimento, enquanto que com pouca umidade o fungo não é capaz de sobreviver. A presença de alumínio no solo também parece ser um fator importante para a sobrevivência do fungo. Grandes quantidades de alumínio limitam ou inibem seu crescimento. Corroborando com essa hipótese estudos feitos com tatus provenientes de regiões de solo rico em alumínio revelaram que a maioria dos animais capturados em regiões ricas em alumínio não apresentavam contaminação pelo fungo (Bagagli *et al.*, 2003;Tercarioli *et al.*, 2007). Ainda existem outros fatores ambientais que poderiam exercer alguma influência sobre o nicho ocupado por *P. brasiliensis* que ainda foram pouco explorados, entre eles a interação desse fungo com outros organismos de solo, a competição por recursos e predação por organismos fagocíticos e nematoides. Além disso é importante observarmos que o fungo pode ocupar

mais de um nicho ecológico em seu ciclo de vida. Durante sua fase de micélio no solo ele sofre influências como temperatura e tipo de solo, umidade e competição com outros microorganismos. Já em sua fase de levedura, quando infecta um hospedeiro, o fungo sofre diferentes influências como a temperatura corporal, contato com hormônios e o ataque do sistema imune (Figura 2) (Bagagli *et al.*, 2008).



□ Dados não foram provados para *P. brasiliensis*, mas já foram observados em outros fungos da ordem Onygenales

* A entrada de conídios por trauma não deve ser descartada principalmente quando se trata de isolados que não produzem conídios

Figura 2. **Ciclo de vida hipotético de *Paracoccidioides brasiliensis*.** O fungo inicia seu ciclo de vida no solo na forma de micélio produzindo conídios que podem ser lançados no ar. Nesse meio ele enfrenta uma série de forças seletivas impostas pelo ambiente ou por outros microorganismos que podem aumentar a frequência de variantes mais virulentas do fungo. Os conídios, então, entram em seu hospedeiro mamífero por inalação ou através de um trauma e sofrem a mudança para a forma de levedura, estabelecendo assim a infecção. Dentro do hospedeiro ele enfrenta outras forças seletivas como temperaturas mais altas e um sistema imune. *P. brasiliensis* é ingerido por macrófagos, porém pode sobreviver e passar por um período de latência ou se replicar no interior dessas células dando início a doença. Após a morte do hospedeiro *P. brasiliensis* pode retornar ao solo, assim como já foi observado em outros fungos da ordem Onygenales, dando início a um novo ciclo. Adaptado de Bagagli *et al* (2008).

1.3) Origem e manutenção da virulência em *Paracoccidioides brasiliensis* e outros fungos patogênicos

Um número de potenciais mudanças fisiológicas e morfológicas que ajudam fungos patogênicos a infectar e estabelecer uma doença são comumente chamados de fatores de virulência (Kurokawa *et al.*, 1998). Um organismo virulento somente pode ser definido na presença de um hospedeiro susceptível. Sua virulência é o efeito da interação entre ele e seu hospedeiro e depende de uma série de fatores presentes em ambos (Casadevall e Pirofski, 2001; Garcia-Solache *et al.*, 2013). Dimorfismo, aderência a células do hospedeiro, presença de α -1,3-glucana na composição da parede celular e produção de enzimas como proteases, lipases e fosfolipases são observados em *P. brasiliensis* e em outros fungos considerados patogênicos (San-Blas e Vernet, 1977; Mendes-Giannini *et al.*, 2004). Um importante fator de virulência é a tolerância a temperaturas mais elevadas, uma vez que a maioria dos hospedeiros vertebrados possuem uma temperatura corporal mais elevada que a temperatura ambiente. A temperatura corporal elevada é um importante mecanismo de defesa contra a maioria das doenças, especialmente aquelas causadas por fungos, uma vez que a maioria desses fungos crescem melhor na temperatura ambiente. A tolerância a essas temperaturas é comum nas principais espécies de fungos patogênicos capazes de causar infecções sistêmicas como *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii* e *Paracoccidioides brasiliensis* (Kurokawa *et al.*, 1998; Casadevall, 2012).

O antígeno gp43 encontrado em *P. brasiliensis* também é considerado um importante fator de virulência do fungo. Estudos indicam que gp43 encontrado na parede celular do fungo pode ser responsável pela sua adesão a componentes da matriz celular como laminina e também atuar com um efeito proteolítico em colágeno, elastina e caseína (Mendes-Giannini *et al.*, 1990; Vicentini *et al.*, 1994; Torres *et al.*, 2013). A forma com que um antígeno é capturado e processado por diferentes células apresentadoras de antígeno vai depender de diversos fatores como a rota de entrada desse antígeno ou o estado do sistema imune do hospedeiro. Células T CD4⁺ são centrais para o funcionamento de todo o sistema imune. Essas células são responsáveis pela coordenação, expansão e regulação de células T CD8⁺ além de facilitar respostas de células B e recrutar múltiplos componentes do sistema imune inato. Células T CD4⁺ passam por um processo de diferenciação após um contato inicial com o antígeno. Esse processo vai depender da presença de citocinas e moléculas coestimulatórias e também do tipo de patógeno encontrado. Essa diferenciação pode afetar as características

funcionais da célula e pode determinar o tipo de resposta do hospedeiro que vai resultar na eliminação ou sobrevivência do patógeno (Ferreira *et al.*, 2003; Muranski e Restifo, 2013). Gp43 possivelmente possui um efeito imunomodulatório após a infecção por *P. brasiliensis*. Em estudos realizados por Torres *et al* (2013) foram utilizadas técnicas de silenciamento gênico para reduzir a expressão de GP43 de leveduras do fungo. Foi observado que macrófagos estimulados com IFN- γ são mais eficientes em fagocitar e eliminar leveduras com o gene GP43 silenciado. Foi observado também um aumento na produção de TNF- α apenas em macrófagos que entraram em contato com leveduras com o gene silenciado. Além disso, experimentos mostraram uma menor patogenicidade do fungo com o gene silenciado quando infecta camundongos, provavelmente devido a um aumento na produção de IFN- γ e TNF- α e um decréscimo na produção de IL-10 e IL-6 (Taborda *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2013).

P. brasiliensis e diversos fungos patogênicos, como *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e *Sporothrix schenckii* possuem vários fatores de virulência em comum, entre essas estratégias para sobrevivência nos tecidos do hospedeiro. Entretanto, esses fungos são encontrados no ambiente associados ao solo e não necessitam de um hospedeiro mamífero para replicação ou disseminação. Se esses fungos não necessitam de um hospedeiro, porque possuem e mantem fatores de virulência para sobreviver a um ambiente inóspito, como o interior de um macrófago? Para responder essa pergunta alguns grupos tem investido em estudos sobre a interação de fungos patogênicos com organismos de solo, entre esses, protozoários como *Acanthamoeba castellanii*, *Dictyostelium discoideum*, e nematóides (Steenbergen *et al.*, 2001; Mylonakis *et al.*, 2002; Casadevall *et al.*, 2003; Steenbergen *et al.*, 2003). Segundo essa vertente, certos aspectos da patogênese de fungos podem ter sido selecionados em resposta a interação desses organismos com outros organismos presentes no solo. A vida no solo está sujeita a mudanças climáticas, inundações, dessecação, radiação solar além da predação de organismos como nematoides, amebas e outros protistas que se alimentam de bactérias e leveduras. As condições encontradas no solo poderiam ter exercido uma das pressões seletivas para a origem e manutenção de fatores de virulência que auxiliariam o fungo a sobreviver nas condições impostas pelo ambiente e sobreviver ou escapar da fagocitose de predadores. A proposta dos autores dessas idéias é que tais atributos de virulência foram parcialmente selecionados durante a evolução favorecendo a sobrevivência desse fungo durante a interação com predadores ambientais (Steenbergen *et al.*, 2001). Dessa forma, poderíamos dizer que esses fungos na verdade seriam patógenos

acidentais. A virulência adquirida por eles e a capacidade de sobreviver em seu hospedeiro seriam produtos gerados da adaptação para sobreviver em seu ambiente natural. Além disso esses fungos apresentam pouca especificidade em relação aos hospedeiros que infecta, sendo capazes de infectar hospedeiros filogeneticamente distantes, mostrando que eles possuem fatores de virulência bastante robustos e que podem ser usados com diferentes propósitos (Casadevall *et al.*, 2003; Casadevall e Pirofski, 2007; Garcia-Solache *et al.*, 2013).

Amebas e macrófagos apresentam várias características em comum por serem células fagocitárias, incluindo a sua habilidade em fagocitar partículas, sequestrá-las em vacúolos e secretar enzimas lisossomais para digeri-las. Assim, foi mostrado que várias das estratégias desenvolvidas por patógenos intracelulares para sobreviverem dentro do ambiente inóspito de macrófagos também favorecem sua sobrevivência durante a interação com potenciais predadores de solo (Swanson e Hammer, 2000). O primeiro exemplo com fungos foi proposto com o estudo de *C. neoformans* e foi observado que a ameba *A. castellanii* é capaz de fagocitar o fungo, e que o fungo é capaz de se replicar dentro da ameba, do mesmo modo que em macrófagos. Posteriormente outros estudos foram feitos com fungos dimórficos como *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* e *Blastomyces dermatitidis*. Apesar desses fungos viverem no solo na sua forma miceliana, é possível que possa existir populações heterogêneas contendo leveduras, principalmente em regiões mais quentes onde o solo pode atingir temperaturas mais elevadas. Além disso, a forma miceliana pode funcionar como uma estratégia para prevenir a predação desses fungos por amebas e outros organismos de menor porte (Steenbergen *et al.*, 2001; Steenbergen *et al.*, 2004).

Casadevall *et al* (2003) sugeriu dois conceitos para estudos da interação entre fungo e ameba: “Ready-made virulence” e “Dual-use virulence”. De acordo com essas hipóteses o fungo poderia ter originado seus fatores de virulência no solo para sobreviver a pressão seletiva do ambiente, ou seja, a virulência já estava “pronta” quando ele infectou um hospedeiro vertebrado pela primeira vez. Além disso, eles observaram que vários dos fatores que favorecem a sobrevivência do fungo em macrófagos, também auxiliam na sua sobrevivência durante a interação com as amebas, dando aos fatores de virulência um “duplo” uso. Fatores como o acúmulo de vesículas contendo polissacarídeos da cápsula e a produção de fosfolipases podem ter mais de uma função na sobrevivência de um fungo. A cápsula em *C. neoformans* que aumenta a virulência quando fungo infecta um hospedeiro vertebrado também pode atuar prevenindo a fagocitose por amebas de solo e ainda proteger contra a dissecação. Similarmente a presença de melanina que protege contra estresses do ambiente

está associada ao aumento da virulência do fungo quando infecta animais (Casadevall *et al.*, 2003; Nosanchuk e Casadevall, 2006; Casadevall e Pirofski, 2007).

1.4) *Acanthamoeba castellanii* e outros organismos como modelo para o estudo de fungos patogênicos.

Amebas de vida livre são protozoários oportunistas amplamente distribuídos na natureza. Podemos encontrar espécies desse microrganismo em diversos tipos de ambiente como solo, ar, água doce e salgada. Entretanto apenas quatro gêneros são capazes de infectar o ser humano: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* e *Sappinia* (Rivera *et al.*, 1987; Schuster e Visvesvara, 2004; Visvesvara *et al.*, 2007). *Acanthamoeba* spp. é o gênero mais comum e amplamente distribuído em todo o planeta. Pode sobreviver a 37°C, suporta uma grande variação na temperatura, pH e osmolaridade permitindo que sobreviva em água destilada e seja capaz de infectar indivíduos mamíferos. Já foi isolado em peixes, pássaros, anfíbios, reptéis, mamíferos e já foi encontrado em amostras de tecidos de pulmão, cérebro, lesões de pele e na córnea (Madrigal Sesma, 1988; De Jonckheere, 1991; Mergeryan, 1991; Dykova *et al.*, 1999). *Acanthamoeba* spp. tem dois estágios em seu ciclo de vida: Um estágio vegetativo na forma de trofozoíto (8-40 µm) e outro dormente na forma de cisto (8-29 µm). A forma de trofozoíto se divide por fissão binária e se caracteriza por possuir um núcleo interno e a presença de pseudópodes que auxiliam na captura de presas assim como adesão e movimentação. Os trofozoítos se alimentam de microrganismos como bactérias, algas e leveduras, mas também podem se alimentar de pequenas partículas orgânicas solúveis. É nessa forma que amebas infectam um hospedeiro, entretanto, quando estão em situações adversas como grandes variações de temperatura e pH ela passa para forma de cisto. O cisto é extremamente resistente a grandes variações de temperatura, pH, osmolaridade, resiste a dessecação e longos períodos sem alimentação. Ele possui duas camadas de parede celular (endo e ectocisto) e pequenos poros que são usados para monitorar mudanças no ambiente que, quando favorável, induz o retorno para forma de trofozoíto (Preston e King, 1984; Aksozek *et al.*, 2002; Khan, 2006).

A. castellanii é uma das espécies mais estudadas de amebas. Esse patógeno oportunista é conhecido por causar ceratite, uma doença comumente encontrada em usuários de lente de contato. Essa infecção pode destruir tecidos do olho e levar a cegueira. Os sintomas da doença incluem vermelhidão nos olhos, fotofobia e edema palpebral. Outra doença causada por *A.*

castellanii é a encefalite amebiana granulomatosa. Essa doença ataca o sistema nervoso central e pode ser fatal. Seus sintomas variam entre dores de cabeça, confusão, náusea, vômito, febre e sinais de aumento da pressão intracraniana. Apesar de causar diversas doenças, infecções com *Acanthamoeba* spp. não são comuns. Estudos mostram que mais de 80% da população possuem anticorpos para espécies desse gênero (Martinez *et al.*, 1980; Mietz e Font, 1997; Anderson *et al.*, 2005). Pouco se sabe sobre a patogênese da infecção e os determinantes bioquímicos da virulência de *Acanthamoeba* spp., mas sabe-se que propriedades de aderência, resistência a temperaturas mais elevadas e mecanismos de evasão do sistema imune representam importantes fatores para a patogenicidade da ameba (Mazur e Hadas, 1994; Marciano-Cabral e Cabral, 2003). As lectinas possuem um importante papel na adesão da ameba com a córnea do hospedeiro. Entre as lectinas a mannose-binding protein (MBP) é um conhecido fator de virulência para *Acanthamoeba* spp. Ela auxilia na adesão da ameba à córnea do hospedeiro através de interações de lectinas na superfície da ameba com resíduos de manose no epitélio da córnea. Para entender melhor o papel funcional da MBP, Yoo e Jung (2012) realizaram experimentos em que a MBP de *A. castellanii* foi saturada com manose. Os resultados mostraram que a citotoxicidade, capacidade de adesão e a fagocitose foram comprometidos após o tratamento das células com manose, mostrando que essa proteína tem um importante papel na virulência desse protozoário (Garate *et al.*, 2004; Yoo e Jung, 2012). *Acanthamoeba* spp. é bastante estudada não só devido a sua associação com diversas doenças em pessoas imunocomprometidas e sua grande importância no ecossistema, mas também pela possibilidade de servir como reservatórios ou “Cavalos de Troia” para outros microrganismos (Fields *et al.*, 1984; Siddiqui e Khan, 2012a). Bactérias patogênicas conseguem sobreviver à fagocitose por *Acanthamoeba* spp. e continuar viáveis em seu interior. Dessa forma a ameba pode atuar como um “veículo transportador” levando outros microrganismos para o interior de seu hospedeiro ou como um reservatório em que bactérias podem se reproduzir em um ambiente mais favorável (Greub e Raoult, 2004; Alsam *et al.*, 2006). Existem estudos mostrando que a interação com *Acanthamoeba* spp. pode atuar como um “treinamento” em que bactérias desenvolvem estratégias para escapar da fagocitose, conseqüentemente tornando-se mais resistentes ao ataque de macrófagos. Os mecanismos utilizados por essas bactérias para escapar da fagocitose da ameba são os mesmos utilizados para escapar e sobreviver a macrófagos. Por exemplo, a forma com que *L. pneumophila* sobrevive a fagocitose por *Acanthamoeba* depende dos mesmos genes (icmT, icmR, icmQ, icmP, icmO, icmM, icmL, icmK, icmE, icmC, icmD, icmJ and icmB) utilizados para

sobreviver ao macrófago no interior de seu hospedeiro (Segal e Shuman, 1999; Siddiqui e Khan, 2012b).

Muitos estudos sobre os mecanismos moleculares com o qual microrganismos interagem com hospedeiros humanos são feitos em modelos mamíferos. Entretanto, modelos mamíferos podem apresentar algumas dificuldades como ciclos reprodutivos longos, maior complexidade anatômica e fisiológica e custos elevados. Além disso a maioria dos estudos focam apenas no microrganismo, ou na resposta do hospedeiro, ou na caracterização de novos compostos terapêuticos separadamente devido à falta de um modelo que englobe todos esses aspectos. Nos últimos anos uma série de organismos invertebrados vem sendo descritos como novos modelos que permitem a aplicação de estudos para interação entre fungo-hospedeiro. Assim, pesquisadores vem utilizando modelos invertebrados por serem mais simples de trabalhar, demandarem custos mais baixos de manutenção e por muitas vezes serem mais indicados para o tipo de pesquisa que estão realizando (Mylonakis *et al.*, 2007).

Alguns desses organismos invertebrados tem sido cada vez mais utilizados para o estudo da virulência de patógenos humanos. São notáveis as similaridades entre o sistema imune inato desses invertebrados com o de mamíferos (Kavanagh e Reeves, 2004). Entre esses invertebrados um dos que vem sendo mais utilizados são as larvas da mariposa *Galleria mellonella*. As larvas de *G. mellonella* são fáceis de manipular e os custos para mantê-las são baixos (Reeves *et al.*, 2004). O sistema imune desse inseto é similar ao de mamíferos em vários aspectos. Ele possui seis tipos de hemócitos e fagócitos que são capazes de fagocitar células fúngicas de espécies como *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus spp.* por exemplo. Além disso a cinética da fagocitose e a morte microbiana são similares às de neutrófilos humanos (Kavanagh e Reeves, 2004; Reeves *et al.*, 2004; Bergin *et al.*, 2005; Mylonakis *et al.*, 2005; Mylonakis *et al.*, 2007). Peptídeos antimicrobianos também são observados no sistema imune desse inseto. Esses peptídeos desempenham importantes funções na imunidade de insetos uma vez que eles não possuem sistema imune adaptativo (Cytrynska *et al.*, 2007).

Larvas de *G. mellonella* já foram utilizadas em estudos com diversos microrganismos patogênicos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus flavus*, *Paracoccidioides lutzii* e *Histoplasma capsulatum* (Jarrell e Kropinski, 1982; Lemaitre *et al.*, 1996; St Leger *et al.*, 2000; Apidianakis *et al.*, 2004; Mylonakis *et al.*, 2005; Fuchs *et al.*, 2010; Achterman *et al.*, 2011; Thomaz *et al.*, 2013). Estudos com *P. lutzii* indicam que larvas de *G. mellonella* podem ser utilizadas no estudo da

PCM e servem como modelo de hospedeiro para o estudo da virulência desse microrganismo. De acordo com Thomaz *et al* (2013) larvas de *G. mellonella* infectadas com leveduras de *P. lutzii* apresentam granulomas semelhantes aos encontrados em mamíferos diagnosticados com PCM (Buissa-Filho *et al.*, 2008; Thomaz *et al.*, 2008; Thomaz *et al.*, 2013).

Acanthamoeba castellanii também pode ser um bom modelo de estudos para fagócitos humanos. Ambas as células possuem diversas similaridades morfológicas e estruturais como: forma de locomoção, capacidade de sobreviver a 37°C, habilidade de interagir e fagocitar microrganismos patogênicos, sequestro das partículas ingeridas no interior de vacúolos e secreção de enzimas lisossomais para degradação dessas partículas fagocitadas (Swanson e Hammer, 2000). Ambas utilizam mecanismos dependentes de actina para projetar pseudopodos que atuam tanto na locomoção como na fagocitose. Grande parte do conhecimento sobre estrutura e função da actina e miosina em macrófagos vem do estudo com *Acanthamoeba* (Pollard *et al.*, 1970). Assim, se o objetivo é estudar a fagocitose ou processos moleculares que ocorrem próximos a temperaturas corporais de mamíferos o uso da *Acanthamoeba* pode ser um bom modelo experimental. Similarmente, se o objetivo do trabalho é estudar processos de infecção utilizados por fungos em temperaturas corporais mamíferas, o ideal é encontrar organismos resistentes a essas temperaturas e que possuem um sistema imune inato similar ao de mamíferos como *G. mellonella* (Mylonakis *et al.*, 2007). Dessa forma, neste presente trabalho foi escolhida a ameba *A. castellanii* para ser usada como modelo de estudos da interação *P. brasiliensis*-hospedeiro. Além da ameba, larvas de *G. mellonella* também foram utilizadas em um experimento do trabalho e serão utilizadas em experimentos futuros. Nossa hipótese é que o estudo da interação desse fungo com organismos de solo poderá nos levar a uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares responsáveis pela origem e manutenção de fatores de virulência importantes no estabelecimento da infecção em mamíferos por esse fungo.

Esse trabalho faz parte de um projeto maior que vem sendo desenvolvido em nosso grupo, sob coordenação da Dra. Patricia Albuquerque e envolve o estudo da interação de *P. brasiliensis* com diferentes isolados de amebas de solo além do estudo de outros aspectos da virulência e ecologia desse fungo.

2. Objetivos

2.1) Objetivo geral

O objetivo geral desse projeto é analisar a interação entre o fungo patogênico *P. brasiliensis* e amebas, identificando os principais efeitos dessa interação na viabilidade dos dois organismos e na virulência desse fungo.

2.2) Objetivos específicos

- Detecção da interação de amebas com *P. brasiliensis* por ensaio de fagocitose.
- Análise dos principais efeitos da interação entre ameba e *P. brasiliensis* na viabilidade do fungo e da ameba.
- Análise dos efeitos da passagem de *P. brasiliensis* em amebas na virulência desse fungo.

3. Materiais e Métodos

3.1) Meios de cultura

3.1.1) Fava-Neto

Protease peptona	0,3% (p/v)
Peptona	1,0% (p/v)
Extrato de carne	0,5% (p/v)
NaCl	0,5% (p/v)
Dextrose	4,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Ágar	1,6% (p/v)
Ajustou-se o pH para 7,0	

3.1.2) PYG

Peptona	2,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,1% (p/v)
Dextrose	1,8% (p/v)
Ajustou-se o pH para 7,2	

3.1.3) BHI (Brain Heart Infusion)

BHI	3,7% (p/v)
Dextrose	0,8% (p/v)
Ágar	1,5% (p/v)
Soro de cavalo	4,0% (v/v)
Filtrado de linhagem Pb 192	5,0% (v/v)

Ajustou-se o pH para 7,3

(Filtrado de linhagem Pb 192 é usado como fator de promoção de crescimento)

3.2) Corantes

3.2.1) Solução de Azul de tripano (0,4%)

NaCl	0.81%
KH ₂ PO ₄	0,06%

3.2.2) Uvitex 2B

Solução estoque: 1% diluído em PBS

Concentração final de uso: 0,01%

3.2.3) CMFDA

Solução estoque: 10 mM em DMSO

Concentração final de uso: 15 μ M

3.2.4) DID-DS

Solução estoque: 2mg/mL em DMSO

Concentração final de uso: 2 μ M

3.3) Tampão para preparo de amostras para microscopia eletrônica

3.3.1) Tampão cacodilato de sódio

Sacarose 3,0% (p/v)

CaCl₂ 3mM

Ajustou-se pH para 7,2

3.4) Solução de lavagem das células

3.4.1) Tampão fosfato (PBS) 10X

NaCl	1,5 M
Na ₂ HPO ₄	0,1 M
NaN ₃	0,02 %

O pH foi ajustado para 7,2.

3.5) Linhagens celulares e Manutenção

3.5.1) *Paracoccidioides brasiliensis*

A linhagem celular utilizada no estudo foi a Pb18 de *P. brasiliensis* (Singer-Vermes *et al.*, 1989). As células são mantidas na forma de levedura em meio sólido Fava-Netto por 5-7 dias a uma temperatura de 37°C e repicadas semanalmente. Colônias foram retiradas diretamente do meio sólido dispersas em meio líquido e agitadas em vortex e por 2 min na presença de pérolas de vidro para diminuir a quantidade de grumos para utilização nos experimentos. A contagem do número de células foi feita em câmara de Neubauer.

3.5.2) *Acanthamoeba castellanii*

A linhagem celular utilizada foi a 30234 (*American Type Culture Collection* - ATCC, Manassas, VA, USA) . As células foram mantidas em garrafas de cultura com meio PYG por 5-7 dias a uma temperatura de 27 °C e repicadas após uma semana. As células foram descoladas através da agitação das garrafas e contadas em câmara de Neubauer para utilização nos experimentos.

3.6) Microscopia confocal

Um inóculo de 2×10^6 células de *A. castellanii*, em 400 µL de meio PYG, foram depositadas sobre lamínulas estéreis presentes nos poços de microplacas de seis poços e incubadas a Temperatura de 28°C por 24h. Após a adesão, as amebas foram coradas com a sonda fluorescente DiD-DS (corante vermelho), que marca bicamadas lipídicas. Em seguida, as amebas foram cocultivadas com 1×10^7 leveduras de *P. brasiliensis* (a proporção

ameba/levedura de 1:2) previamente coradas com CMFDA (corante verde), que marca proteínas intracelulares do fungo. Após 2h de cocultura a 28°C as células foram coradas com Uvitex 2B (corante azul), que marca quitina na parede celular de fungos não internalizados, uma vez que este corante não atravessa a membrana plasmática. Em seguida as lamínulas contendo amebas e *P. brasiliensis* foram lavadas, fixadas e montadas em lâminas para microscopia confocal. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio confocal a laser Leica SP5 equipado com objetiva de 63X. A proporção de ameba/levedura de 1:2 foi definida utilizando protocolos previamente definidos para outros fungos já estudados (Steenbergen *et al.*, 2004).

3.7) Microscopia eletrônica de transmissão

Células de *A. castellanii* foram adicionadas em meio PYG em frascos de cultura de 600mL a uma densidade de 10^7 células por frasco. Após a adesão, as amebas foram infectadas com *P. brasiliensis* usando uma proporção ameba/levedura de 1:2 e mantidas a 28°C por 6h. Em seguida, as células foram retiradas dos frascos, centrifugadas (600 g / 10 min), lavadas com tampão PBS e fixadas em 2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído e 0,1 M tampão cacodilato de sódio durante a noite. Após a fixação, as células foram coletadas por centrifugação (600 g / 10 min) e lavadas três vezes com 0,1 M tampão cacodilato de sódio. A amostra foi pós-fixada por 1h com 1% de tetróxido de ósmio e 0,8% ferrocianeto de potássio em tampão cacodilato de sódio, contrastada *en bloc* com 0,5% de acetato de uranila e seguida por desidratação em gradientes de acetona e inclusão em resina Spurr. Seções ultrafinas feitas no ultramicrotono foram observadas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1011 a 80 kV.

3.8) Cinética da internalização de leveduras de *P. brasiliensis* pela ameba *A. castellanii*

Células de *A. castellanii* e *P. brasiliensis* foram coincubadas usando uma proporção ameba/levedura de 1:2 em placas de 24 poços contendo 400 µL final de meio líquido PYG. Antes da coicubação células de *A. castellanii* (5×10^5 células/mL) foram incubadas por 24 horas a 28°C para permitir a sua adesão e multiplicação chegando a 10^6 células/mL, o sobrenadante contendo meio de cultura e células não aderidas foi removido. Células aderidas foram lavadas com solução salina estéril e incubadas com 2×10^6 células de *P. brasiliensis*. Os sistemas foram então mantidos a 28 °C por 30 min, 1, 2, 4 e 6 horas e a visualização da

fagocitose foi feita a partir de imagens de microscopia óptica de fluorescência. Células de *P. brasiliensis* foram coradas antes da coincubação com o corante Uvitex, que se liga a quitina da parede celular de fungos. Foram feitas imagens de diferentes planos focais (Z-stack) para garantir que o fungo visualizado estava no interior da ameba. Após o tempo de interação os poços foram lavados com PBS para retirar os fungos não internalizados. Foram contadas no mínimo 100 células/poço para determinar a porcentagem de fagocitose. Esse valor é definido como o número de *A. castellanii* com leveduras internalizadas dividido pelo número total de células de *A. castellanii* contadas mostrado na forma de porcentagem. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.9) Ensaio de viabilidade de *Acanthamoeba castellanii*

Células de *A. castellanii* (5×10^5 células/mL) foram incubadas em placas de 24 poços contendo 400 μ L final de meio PYG líquido por 24 horas a 28°C para permitir a sua adesão e multiplicação, chegando à densidade celular de 10^6 células/mL, o sobrenadante contendo meio de cultura e células não aderidas foi removido. Após a adesão das amebas, células de *P. brasiliensis* foram adicionadas usando uma proporção ameba/levedura de 1:2 e mantidas a 28°C e 37°C por 6, 24 e 48 horas. Após os intervalos de tempo as células foram ressuspendidas e observadas em câmara de Neubauer por microscopia óptica. A análise da viabilidade de *A. castellanii* foi feita com o uso do corante vital Azul de tripano que cora células mortas em azul por sua incapacidade de expulsar o corante. Foram contadas 100 células de ameba por poço e a porcentagem da viabilidade é determinada pelo número de amebas incapazes de excluir o corante, pelo número total de células contadas. O controle representa células de *A. castellanii* incubadas sem cocultivo com *P. brasiliensis*. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.10) Ensaio de viabilidade de *P. brasiliensis* quando na interação com *A. castelani*, empregando diferentes metodologias

3.10.1) Determinação de unidades formadoras de colônia – CFU de acordo com Singer-Vermes *et al.* (1992)

Células de *P. brasiliensis* (2×10^6 células/mL) foram adicionadas a culturas de *A. castellanii* em poços de uma placa de 24 poços usando uma proporção fagócito/levedura de 1:2 e

incubadas a 28°C por 6 e 24 horas. A cada intervalo de tempo as células foram ressuspensas dos respectivos poços e as amebas lisadas pela adição de deoxicolato de sódio 12mM. Este tratamento promove a lise das amebas, mas não afeta a viabilidade do fungo. As células do fungo foram centrifugadas (4000 rpm / 10 min), lavadas para retirar o excesso de deoxicolato de sódio e então plaqueadas em meio BHI sólido. Para cada intervalo foram usados 3 poços onde foram feitas diluições seriadas. As placas foram incubadas a 37°C e o número de colônias foi contado após 14 dias. O controle representa células de *P. brasiliensis* sem a coincubação com a ameba.

3.10.2) Ensaio de viabilidade empregando o método XTT

Para avaliar a viabilidade de *P. brasiliensis* após agitação em vortex na presença de pérolas de vidro, análises de viabilidade celular foram realizadas utilizando-se o reagente XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide), o qual avalia a atividade mitocondrial, sendo clivado por enzimas desidrogenases de células ativas e resultando na formação de cristais de formazan com coloração alaranjada e solúvel em água que pode ser mensurado por absorvância a 490 ou 450 nm (Roehm et al., 1991). Para realização do ensaio, células de *P. brasiliensis* foram coletadas em PBS, contadas e separadas em dois tubos com quantidades iguais do fungo. Um dos tubos foi submetido à vigorosa agitação em vortex com pérolas de vidro e o outro foi utilizado como controle. As células são então passadas para uma placa de 96 poços onde é adicionado XTT (0,5 mg/mL) e menadiona para concentração final de 10µM. A placa foi incubada a 37°C com proteção da luz por 4 horas e com uma leitora de placa foi determinada a absorvância a 495 nm.

3.10.3) Ensaio de viabilidade empregando a coloração com Azul de tripano

Para avaliar os efeitos da agitação em vortex na presença de pérolas de vidro nas leveduras de *P. brasiliensis*, análises de viabilidade celular foram realizadas utilizando-se o corante vital Azul de tripano, que cora células mortas por sua inabilidade de expulsar o corante. Para realização do ensaio, células de *P. brasiliensis* foram coletadas em PBS, contadas e separadas em dois tubos com quantidades iguais do fungo. Um dos tubos, contendo pérolas de vidro foi submetido a agitação em vortex e o outro foi utilizado como controle. As células foram então coletadas e transferidas para um tubo de microcentrifuga onde foi adicionado o corante vital Azul de tripano na proporção de 1:1. Após rápida agitação as células foram transferidas para uma câmara de Neubauer onde foram contadas até 100 células. A porcentagem da viabilidade

é definida pelo número de células coradas dividido pelo número total de células contadas mostrado na forma de porcentagem.

3.11) Análise do efeito na virulência fúngica pela passagem seriada de *P. brasiliensis* em *A. castellanii*

Células de *P. brasiliensis* (2×10^6 células/mL) foram adicionadas a culturas de *A. castellanii* em poços de uma placa de 24 poços usando uma proporção ameba/levedura de 1:2 e incubadas a 28°C por 6 horas. Após o intervalo de tempo as células foram ressuspensas e as amebas lisadas pela adição de deoxicolato de sódio 12mM (concentração que lisa células de ameba mas não lisa células de *P. brasiliensis*). Os fungos coletados foram lavados três vezes e ressuspensos em PBS para, posteriormente, serem plaqueados em meio BHI sólido e incubados a 37°C por 7 a 15 dias. As colônias de *P. brasiliensis* resultantes foram coletadas e as células do fungo passam pelo mesmo processo descrito por 6 vezes. Após a passagem pelas amebas por 6 ciclos o fungo foi coletado e inoculado em grupos de 10 larvas de *Galleria mellonella* para realização de uma curva de sobrevivência. Para essa curva foram feitos dois controles, um deles corresponde ao inóculo do fungo não submetido pelos ciclos de passagens seriadas em *A. castellanii* e outro que corresponde a um inóculo apenas com PBS. Os inóculos foram introduzidos nas larvas utilizando-se uma seringa. Após o inóculo as larvas são mantidas a 37°C e checadas a cada 24h para observar sua viabilidade.

3.12) Efeito de *A. castellanii* na filamentação de *P. brasiliensis*

Dado a importância do dimorfismo na biologia de *P. brasiliensis*, observamos que quando em contato com a ameba, sua transição dimórfica de levedura para hifa era inibida. Desta forma, passamos a avaliar o possível mecanismo à base desta inibição. A seguir, são descritos o enfoque dado a esta questão biológica.

3.12.1) Extração de lipídios de *Acanthamoeba castellanii*

Para estudar os mecanismos utilizados por *A. castellanii* para inibição da filamentação de *P. brasiliensis* foi realizada uma extração de lipídios da ameba. Os lipídios extraídos foram posteriormente utilizados na incubação de uma cultura do fungo. A extração dos lipídeos foi realizada segundo o método de Folch (1957) onde as células foram lisadas obtendo-se no final

do procedimento frações polares e apolares do lisado celular (Folch *et al.*, 1957). Células de *A. castellanii* foram adicionadas em meio PYG em uma garrafa de cultura celular a uma densidade de 10^7 células. Após a adesão, as células foram removidas por agitação e centrifugadas (600 g / 10 min) para remover o excesso de meio. Foi adicionada às células uma mistura de clorofórmio/metanol (2/1) com um volume final de 20X, relativo ao volume da amostra. A mistura foi agitada em um orbital shaker por 15-20 min a temperatura ambiente. Essa mistura foi então filtrada com papel filtro tendo sido recolhida apenas a fase líquida. Acrescentou-se PBS 1X (0,2V do volume final da mistura) e após agitação em vortex por alguns segundos a mistura foi centrifugada (2000 rpm/ 10 min) para separação das fases polar e apolar. As fases foram separadas delicadamente para não misturá-las, utilizando uma pipeta Pasteur, sendo cada uma transferida separadamente para tubos novos. A seguir, cada amostra relativa a cada uma das fases, foi aliquoteada em tubos de 1,5 mL do tipo eppendorf, e submetida à secagem utilizando um speedvac (Folch *et al.*, 1957).

3.12.2) Incubação de *P. brasiliensis* com fração polar da extração de lipídios de *A. castellanii*

P. brasiliensis foi coletado diretamente do meio Fava-Neto sólido, lavado três vezes em PBS e contado. As células (5×10^5 por poço) foram transferidas para uma placa de 24 poços contendo YPD. A fase polar da extração de lipídios de *A. castellanii* foi diluída em PBS em três concentrações diferentes. A primeira concentração contendo o equivalente a um tubo de 1,5 mL da extração, a segunda concentração contendo o equivalente a dois tubos de 1,5 mL da extração e a terceira concentração contendo o equivalente a três tubos de 1,5 mL da extração. As três concentrações foram adicionadas em diferentes poços e a placa foi então incubada à temperatura de 28°C. Após dois dias de incubação imagens de microscopia óptica foram obtidas para observar o processo de transição dimórfica do fungo. Foram feitos dois controles para esse experimento. O primeiro representa células do fungo incubadas apenas na presença de meio YPD e o segundo representa células do fungo coincubadas com *A. castellanii* na presença apenas de meio YPD.

4. Resultados e Discussão

4.1) Interação entre *A. castellanii* e *P. brasiliensis*

De acordo com estudos realizados por Steenbergen *et al* (2001, 2004) *A. castellanii* é capaz de fagocitar diversos fungos virulentos como *C. neoformans*, *B. dermatitidis*, *S. schenckii* e *H. capsulatum*. O índice de fagocitose varia para cada um desses fungos, mas que ambos fagocitam esses fungos em proporções muito próximas. A maior diferença na internalização pela ameba e por macrófagos observada foi para *H. capsulatum* onde 81% das amebas fagocitaram o fungo enquanto apenas 70% dos macrófagos foram capazes de fagocita-lo (Steenbergen *et al.*, 2001;Steenbergen *et al.*, 2004). Para avaliarmos se *P. brasiliensis* também é capaz de interagir com células de *A. castellanii*, um ensaio de fagocitose foi realizado (Figura 3). Nesse ensaio coincubamos células de *P. brasiliensis* com *A. castellanii* previamente aderidas em uma lâmina para imagens de microscopia confocal. Observamos células de *P. brasiliensis* tanto em processo de fagocitose quanto células fúngicas já ingeridas pelas amebas, corroborando a nossa hipótese de que *P. brasiliensis* também pode interagir com amebas de solo.

Para confirmar que a internalização de fato ocorre usamos alguns corantes para imagens de microscopia confocal. As células de *A. castellanii* foram coradas com DiD-DS (vermelho), uma sonda fluorescente que marca bicamadas lipídicas, enquanto as células de *P. brasiliensis* foram coradas com CMFDA (verde), que marca proteínas intracelulares somente em células vivas. Após a incubação, as células foram ainda coradas com Uvitex, que marca quitina na parede celular de fungos e é incapaz de penetrar a membrana citoplasmática (Levitz *et al.*, 1987). A ausência da coloração por Uvitex em células de *P. brasiliensis* associadas à ameba indica que o fungo realmente foi internalizado pelo protozoário. Também é possível observar que a imagem de luz transmitida mostra uma célula de *P. brasiliensis* dentro da ameba que não foi corada com CMFDA. Como o corante cora apenas células vivas, constatamos que a ameba é capaz de fagocitar tanto fungos mortos quanto vivos.

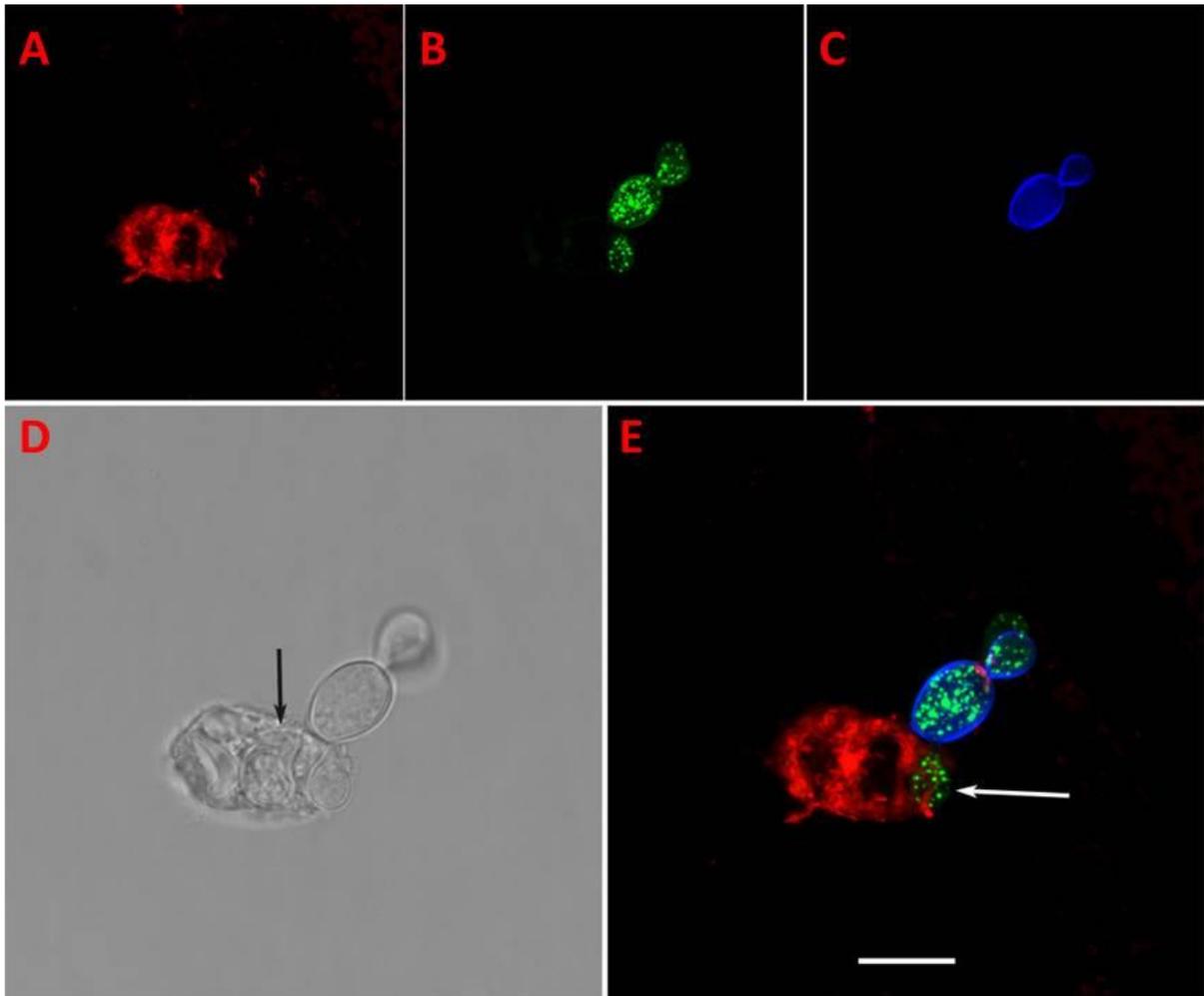


Figura 3. **Microscopia confocal da interação entre *A. castellanii* e *P. brasiliensis*.** (A) Células de *A. castellanii* foram coradas com DiD-DS (vermelho), (B) enquanto *P. brasiliensis* foi corado com CMFDA (verde), (C) e com Uvitex 2B (azul). (D) Imagem de campo claro. A seta preta mostra uma célula do fungo também fagocitada pela ameba mas que não foi corada por nenhum dos corantes. (E) MERGE. A seta branca mostra uma célula do fungo corada com CMFDA que foi fagocitada pela ameba. Barra=10 μ m.

Para melhor visualizarmos o processo de fagocitose, ameba e fungo foram coincubados durante 6h e imagens da interação foram feitas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão (MET). Como mostrado na Figura 4, confirmamos, mais uma vez que *A. castellanii* é capaz de fagocitar *P. brasiliensis* e que após 6h o fungo ainda pode ser encontrado no interior da ameba.

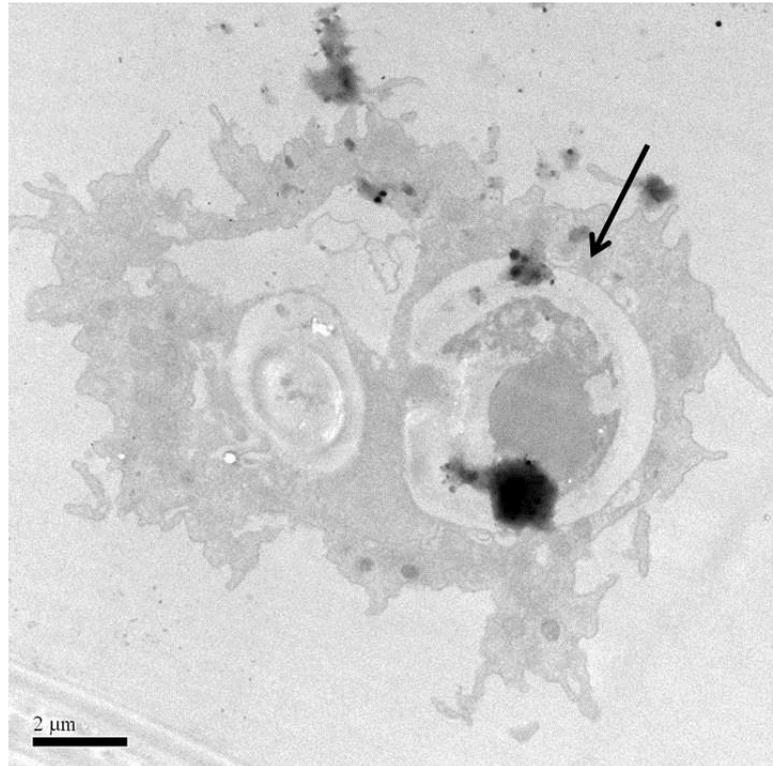


Figura 4. **Microscopia eletrônica de transmissão da interação entre *A. castellanii* e *P. brasiliensis*.** Células de *P. brasiliensis* foram coincubadas com *A. castellanii* durante 6h e processadas conforme descrito anteriormente para obtenção de imagens de MET. Seta indica a célula do fungo no interior da ameba. Barra=2 µm.

4.2) Cinética da internalização de *P. brasiliensis* por *A. castellanii*

Outros ensaios de fagocitose foram realizados para se determinar a porcentagem de amebas capazes de internalizar o fungo. Observamos nos primeiros ensaios que essa porcentagem estava baixa quando comparada com os dados descritos para outros fungos já testados. Uma possível explicação é pelo fato do *P. brasiliensis* formar brotos (em roda de leme por exemplo) e muitas vezes ser encontrado em aglomerados (grumos), o que pode dificultar a fagocitose pelas amebas (Brummer *et al.*, 1993). Para tentar solucionar esse problema, antes dos ensaios, as células de *P. brasiliensis* foram coletadas e agitadas em vortex com pérolas de vidro. Como resultado observamos que os aglomerados diminuíram e muitos brotos se soltaram facilitando a fagocitose e aumentando a porcentagem de internalização. Dois ensaios de viabilidade foram realizados com o fungo após esse processo para verificar se

o mesmo continuaria viável. Os ensaios foram feitos com o corante vital azul de tripano e com o reagente XTT, que avalia a atividade mitocondrial das células (Figura 5). Em ambos os ensaios constatamos que a porcentagem de fungos mortos nos controles, que representa o fungo não submetido a agitação com pérolas de vidro em vortex, era próxima da porcentagem de fungos mortos quando submetidos a agitação com pérolas de vidro em agitador do tipo vortex, constatando que nas condições usadas esse processo não interfere na viabilidade do fungo.

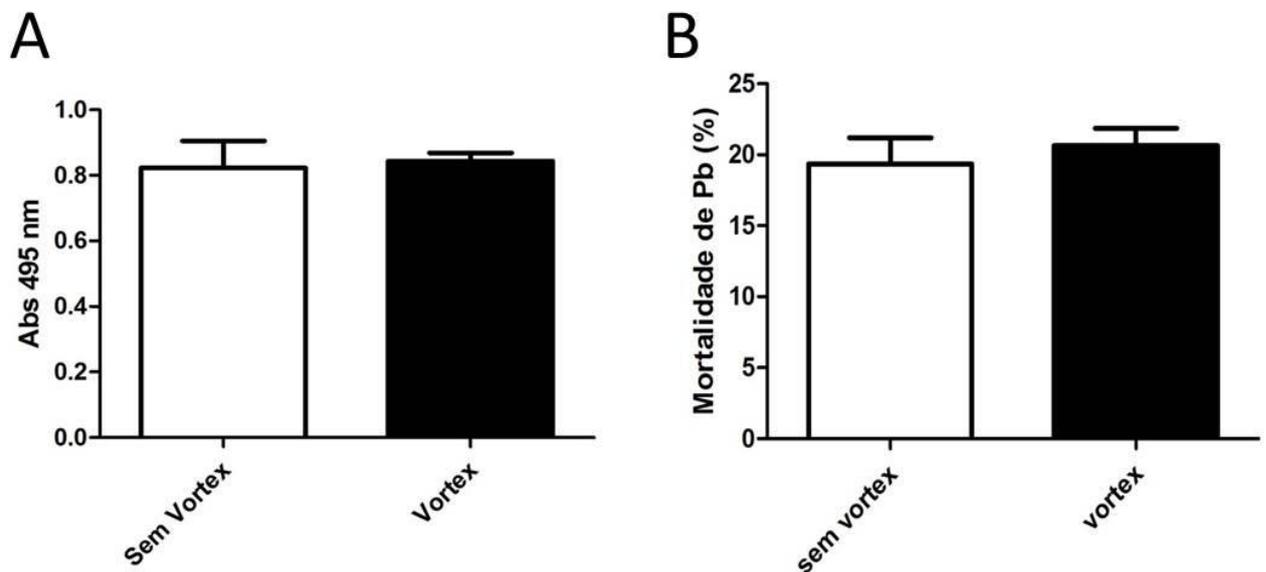


Figura 5. **Viabilidade de *P. brasiliensis* após agitação em vortex com pérolas de vidro.** *P. brasiliensis* foi coletado e vortexado com pérolas de vidro. Controle representa células do fungo que não passaram pelo vortex com pérolas de vidro. (A) Células do fungo foram coletadas antes e após o processo e sua viabilidade foi avaliada pela realização de um ensaio de XTT, conforme descrito previamente. (B) Células do fungo foram coletadas antes e após o processo de desagregação das células por agitação em vortex e a porcentagem de células viáveis foi determinada utilizando o corante vital azul de tripano. Foram contadas 100 células do fungo e a porcentagem é definida pelo número de células coradas dividido pelo número total de células contadas mostrado na forma de porcentagem.

Para observarmos a eficiência de fagocitose de *P. brasiliensis* pela ameba, um novo ensaio de fagocitose foi realizado após o fungo passar pelo protocolo de agitação em vortex na presença de pérolas de vidro (Figura 6) como validado pelos dados mostrados na figura 4. Nesse novo ensaio observamos uma maior eficiência da ameba em fagocitar o fungo. Antes de 30 min de coincubação já conseguimos observar *A. castellanii* internalizando células de *P. brasiliensis*. Imagens de microscopia de fluorescência foram obtidas e analisadas nos tempos de 30 min, 1h, 2h, 4h e 6h. Observamos que houve um aumento na porcentagem de amebas com pelo menos um fungo internalizado até 2h após a coincubação chegando a aproximadamente 70% de fagocitose. Entre 2h e 6h de coincubação essa porcentagem se manteve estável, mas em alguns casos observamos uma ligeira queda. A maioria das células de *A. castellanii* internaliza apenas um fungo, mas foram observadas amebas fagocitando dois ou três ocasionalmente (Figura 7).

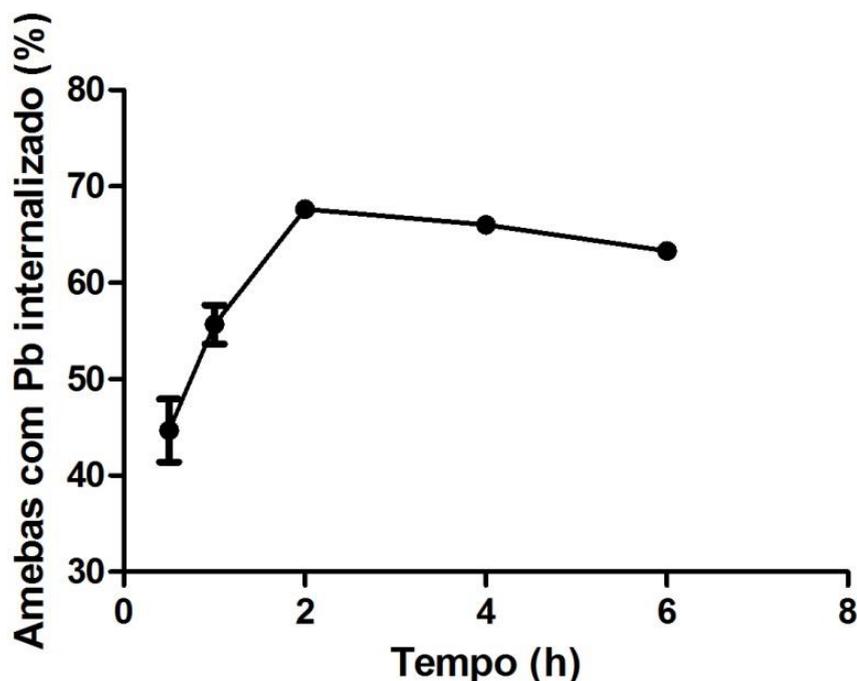


Figura 6. Cinética da internalização de leveduras de *P. brasiliensis* pela ameba *A. castellanii*. Amebas e *P. brasiliensis* foram coincubados usando uma proporção fagócito/levedura de 1:2. Após visualização da fagocitose por microscopia óptica de fluorescência, foram contadas no mínimo 100 células/poço para determinar a porcentagem de fagocitose. Esse valor é definido como o número de *A. castellanii* com leveduras internalizadas dividido pelo número total de células de *A. castellanii* contadas mostrado na forma de porcentagem. O experimento foi realizado em triplicata.

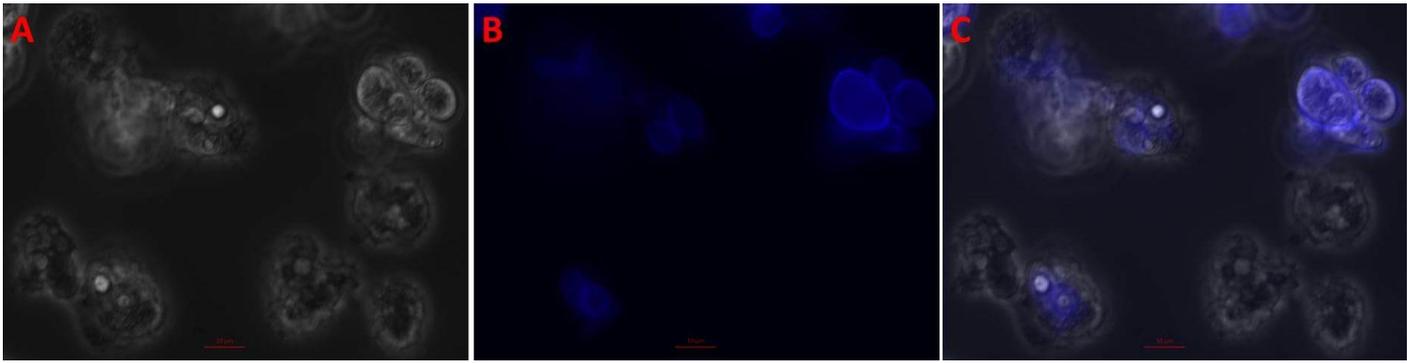


Figura 7. **Microscopia de fluorescência da interação entre *A. castellanii* e *P. brasiliensis*.** *P. brasiliensis* é corado com Uvitex e coincubado com *A. castellanii*. Após o tempo de interação imagens de microscopia de fluorescência de diferentes planos focais (Z-stack) são obtidas para garantir que o fungo visualizado estava no interior da ameba. Imagens representam células após 2h de co-incubação. (A) Contraste de fase. (B) Fluorescência. (C) MERGE. Barra=10µm

4.3) Análise da viabilidade de *P. brasiliensis* e *A. castellanii* após co-incubação

Ensaio de viabilidade de *A. castellanii* quando co-incubada com outros fungos virulentos (*C. neoformans*, *B. dermatitidis*, *S. schenckii* e *H. capsulatum*) mostram que a maioria desses fungos é capaz de sobreviver a fagocitose e em alguns casos induzir a morte das amebas (Steenbergen *et al.*, 2001; Steenbergen *et al.*, 2004). Quando fungos dimórficos como *B. dermatitidis*, *S. schenckii* e *H. capsulatum* são co-incubados com *A. castellanii* em PBS, meio em que ambos possuem dificuldade para se replicar, observa-se a morte da ameba e crescimento do fungo, que utiliza o protozoário como fonte nutricional. Entretanto quando fungos que não sobrevivem no solo como *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* são co-incubados com *A. castellanii* em PBS observa-se a morte do fungo e crescimento da ameba (Steenbergen *et al.*, 2004). Para avaliarmos se *P. brasiliensis* também é capaz de resistir a fagocitose por *A. castellanii* foi realizado um ensaio de viabilidade da ameba quando co-incubada com o fungo nos tempos de 6h, 24h e 48h (Figura 8). *P. brasiliensis* é encontrado na forma de micélio em temperaturas próximas a do ambiente. Então, para certificar que essa transição de levedura para micélio não interfere no resultado, o experimento foi realizado em

duas temperaturas diferentes. A 28°C, temperatura considerada ideal para ameba e 37°C, temperatura em que o fungo é encontrado na forma de levedura (Brummer *et al.*, 1993; Trabelsi *et al.*, 2012). Com esses experimentos observamos que leveduras de *P. brasiliensis* não foram capazes de matar *A. castellanii*, diferente do que já havia sido descrito para outros fungos dimórficos. Em ambas as temperaturas observamos um pequeno aumento na porcentagem da mortalidade de *A. castellanii* quando co-incubada com o fungo, mas que não se mostrou estatisticamente significativo, comparado ao controle (ameba na ausência do fungo). Acreditamos que esse aumento possa ser devido ao estresse do meio, já que há uma competição maior por nutrientes nesse sistema se compararmos com o controle.

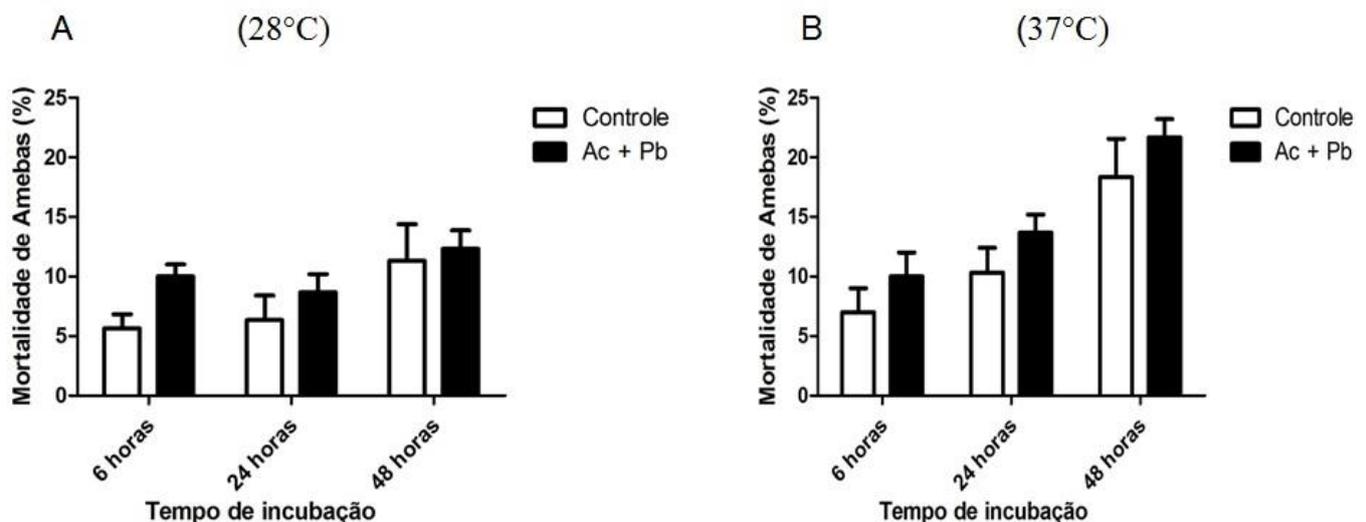


Figura 8. **Porcentagem de mortalidade de Amebas (Ac) após co-cultivo com *P. brasiliensis* (Pb).** (A) Ameba e fungo, na proporção de 1:2, foram co-incubados a 28°C (B) e 37°C. O controle representa células de ameba sem cocultivo com *P. brasiliensis* e a viabilidade avaliada pelo uso do corante vital azul de tripano. O cálculo da porcentagem foi feito a partir da contagem de até 100 amebas viáveis.

P. brasiliensis é capaz de sobreviver a fagocitose por macrófagos. Após a fagocitose o fungo pode entrar em um período de latência ou até mesmo se multiplicar no interior do macrófago. De acordo com Brummer *et al* (1989) há um maior crescimento do fungo quando é co-incubado com macrófagos não ativados. Após a fagocitose *P. brasiliensis* se multiplica no

interior do macrófago destruindo-o e liberando mais células do fungo (Brummer *et al.*, 1989; Moscardi-Bacchi *et al.*, 1994). Entretanto, quando coincubamos *P. brasiliensis* com *A. castellanii* não observamos resultados semelhantes. Analisamos a viabilidade de *P. brasiliensis* quando coincubado com a ameba. Para isso foi realizado um ensaio de CFU nos períodos de 6h e 24h onde o fungo foi recolhido e semeado em meio BHI (Figura 9). Após 6h de coincubação observamos que o fungo mesmo sendo internalizado pela ameba permanecia viável, e quando comparamos com o controle, que representa o fungo incubado sem a presença de *A. castellanii*, observamos que a diferença do número de células viáveis não era estatisticamente significativa. Entretanto, após 24h de coincubação observamos um grande decaimento do número de células fúngicas viáveis. Quando comparamos com o controle observamos um decaimento de mais de 90% na viabilidade de *P. brasiliensis* após 24h de coincubação com a ameba. Isso indica que *A. castellanii* não só sobrevive quando internaliza o fungo como aparentemente é capaz de destruí-lo.

P. brasiliensis é um fungo dimórfico, e em temperaturas abaixo de 28°C é encontrado na forma de micélio. Portanto, quando o fungo é encontrado naturalmente no solo ele geralmente está em sua forma miceliana (Brummer *et al.*, 1993). Acreditamos que isso possa atuar como uma defesa contra microrganismos predadores de solo. Conforme descrito na literatura células fagocíticas como macrófagos ou amebas podem apresentar dificuldades para internalizar fungos quando encontrados na forma de micélio (Brakhage *et al.*, 2010). Esse tipo de comportamento pode ser observado em fungos patogênicos como *Aspergillus fumigatus*. Os conídios dessa espécie de fungo podem crescer e se desenvolver em grandes filamentos no interior dos tecidos de seu hospedeiro. Isso impossibilita sua internalização por células fagocíticas, obrigando o hospedeiro a utilizar outras formas de defesa (Behnsen *et al.*, 2007; Brakhage *et al.*, 2010). *P. brasiliensis* inicia seu processo dimórfico de micélio para levedura a partir de 28°C (Patino *et al.*, 1984). Apesar do fungo só completar seu processo dimórfico a 37°C, acreditamos que algumas de suas células possam ser encontradas naturalmente na forma de levedura em solos mais quentes, possibilitando o ataque de predadores como *A. castellanii*. Entretanto, nossos dados ainda são insuficientes para confirmar a hipótese de que *P. brasiliensis* teria selecionado certos aspectos de sua virulência em resposta à sua interação com predadores de solo. Os experimentos realizados neste trabalho empregaram leveduras que vem sendo cultivadas *in vitro* a um longo período podendo diminuir, assim, sua virulência. Quando *P. brasiliensis* é cultivado *in vitro* por longos períodos observa-se uma diminuição de sua virulência. Dessa forma, novos testes

ainda devem ser feitos utilizando leveduras recém coletadas de animais infectados e/ou do solo, como também usando conídios, que representam a forma de propágulo do fungo.

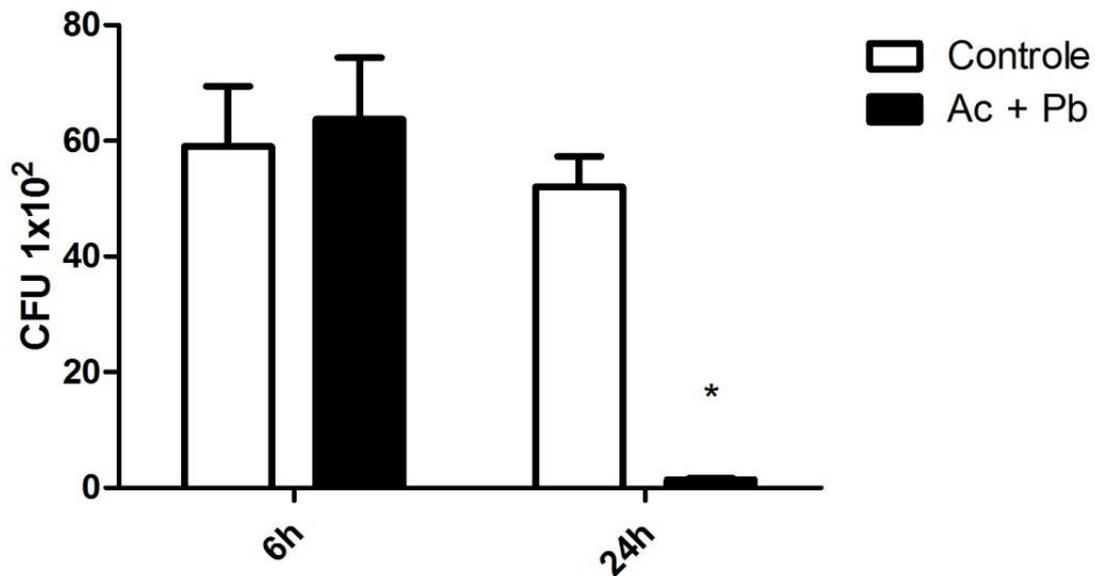


Figura 9. **Viabilidade de *P. brasiliensis* após coincubação com *A. castellanii*.** A viabilidade fúngica foi determinada por contagem de unidades formadoras de colônia (CFU) em meio BHI. O experimento foi realizado na proporção de 1:2 (Ameba/Fungo). O controle representa células de Pb sem a coincubação com a ameba. Os dados foram analisados no GraphPad Prism com teste T não paramétrico e * corresponde a $P < 0,05$. O experimento foi realizado em triplicata.

4.4) *A. castellanii* interfere na filamentação de *P. brasiliensis*

Como citado anteriormente, leveduras de *P. brasiliensis* passam por uma transição dimórfica para forma de micélio quando submetidos a temperaturas abaixo de 28°C. Entretanto, durante a realização de experimentos na temperatura de 28°C observamos que o fungo continua leveduriforme quando coincubado com *A. castellanii*. Em ensaios de fagocitose observamos que grande quantidade do fungo é ingerida e digerida pela ameba, porém, os fungos restantes permaneciam na forma de levedura mesmo quando passavam um

tempo prolongado a 28°C. De acordo com Shankar *et al* (2011) a interação de *P. brasiliensis* com hormônios mamíferos pode influenciar sua transição dimórfica de diversas maneiras. Hormônios são moléculas regulatórias que induzem a regulação da expressão de certos genes através de interações mediadas por receptores localizados nas células. Estudos mostram que hormônios mamíferos podem interagir com diversos fungos com respostas funcionais desses fungos. Esses trabalhos sugerem que sistemas de resposta para hormônios foram conservados evolutivamente e que eles podem desempenhar um importante papel na patogenicidade e no desenvolvimento desses fungos (Shankar *et al.*, 2011). O fato da paracoccidiodomicose afetar mais homens do que mulheres nos sugere que as doses hormonais do hospedeiro possam interferir de alguma forma na sua patogenicidade. Estudos mostram que hormônios femininos podem inibir a transição de *P. brasiliensis* de micélio para levedura e de conídio para levedura interferindo significativamente em sua virulência (Restrepo *et al.*, 1984; Salazar *et al.*, 1988). Levando em consideração estudos da influência de hormônios femininos em *P. brasiliensis* decidimos investigar mais profundamente como *A. castellanii* pode interferir na transição dimórfica do fungo. Para isso, realizamos uma extração de lipídios da ameba e incubamos leveduras de *P. brasiliensis* na temperatura de 28°C com as frações polar e apolar obtidas na extração (Figura 10). Observamos que a fração polar obtida na extração de lipídios da ameba exerce uma influência significativa na transição dimórfica do fungo de levedura para micélio na temperatura de 28°C. Após dois dias de incubação do fungo a 28°C o controle já inicia a transição de levedura para micélio, entretanto quando o fungo é incubado na presença da fração polar da extração de lipídios de *A. castellanii* ele permanece na forma de levedura, indicando que a ameba pode exercer uma influência na transição de levedura para micélio do fungo. Observamos também que a fração polar da extração de lipídios de *A. castellanii* exerce influência dose dependente na transição dimórfica de *P. brasiliensis*. Quanto maior a dose, um menor número de células do fungo iniciam o processo de transição. Mais experimentos devem ser realizados para podermos entender melhor esse processo. A presença de *A. castellanii* pode impedir a transição de levedura para micélio de *P. brasiliensis*, mas não sabemos se a presença da ameba pode afetar a transição dimórfica do fungo de micélio para levedura. Pretendemos realizar esse experimento com outras espécies de fungos dimórficos e também utilizar outras espécies de amebas de solo para observar se o processo se repete.

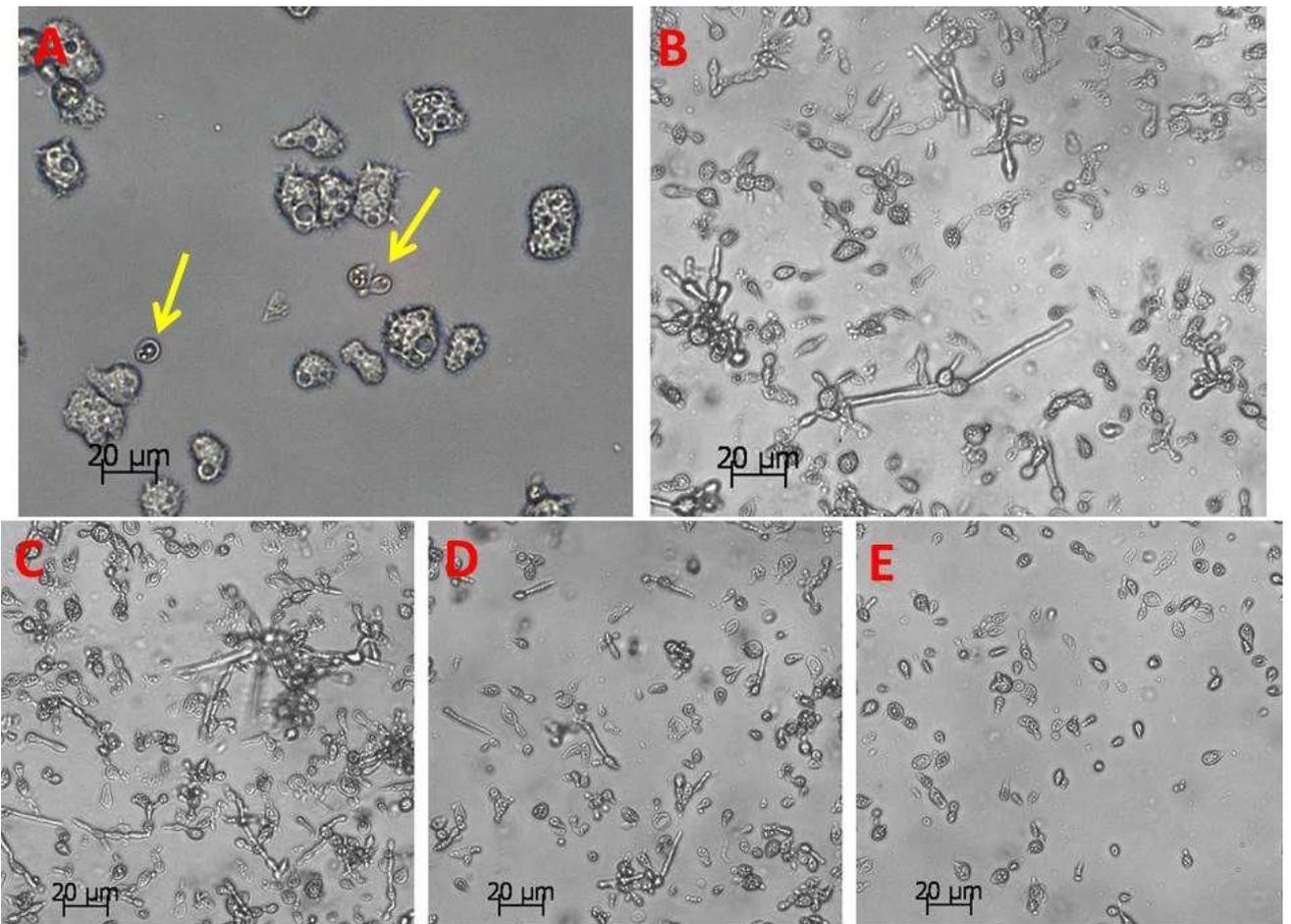


Figura 10. Inibição da filamentação de *P. brasiliensis* pela coincubação com *A. castelani*. O fungo foi incubado na temperatura de 28°C e após dois dias imagens de campo claro foram obtidas utilizando um microscópio óptico. (A) *P. brasiliensis* coincubado com *A. castelani*. Setas amarelas indicam células do fungo leveduriformes. (B) *P. brasiliensis* incubado na ausência de *A. castelani*. (C, D e E) *P. brasiliensis* incubado na presença da fração polar da extração de lipídios de *A. castelani*. (C) Concentração equivalente a um tubo da extração de lipídios. (D) Concentração equivalente a dois tubos da extração de lipídios. (E) Concentração equivalente a três tubos da extração de lipídios.

4.5) Efeito sobre a virulência de *P. brasiliensis* após passagem seriada em *A. castellanii*

C. neoformans pode diminuir sua virulência após várias gerações de cultivo *in vitro*, mas quando é incubado na presença de macrófagos essa virulência é recuperada (Rhodes e Howard, 1980; Franzot *et al.*, 1998). Estudos nos mostram que esse mesmo comportamento pode ocorrer quando *C. neoformans* interage com amebas de solo como *Dictyostelium discoideum*. De acordo com Steenbergen *et al* (2003) o fungo pode apresentar um tamanho de cápsula maior e uma melanização mais rápida após a coincubação com essa ameba. A capsula é essencial para virulência de *C. neoformans* pois tem propriedades antifagocíticas e citotóxicas e a melanização protege contra a ação de radicais livres e peptídios antimicrobianos (Jacobson e Emery, 1991; Feldmesser *et al.*, 2000; Steenbergen *et al.*, 2003). Esse tipo de comportamento já foi observado para outros microrganismos como *Legionella pneumophila*, que aumenta a virulência após interação com amebas de solo (Brieland *et al.*, 1997). Quando *P. brasiliensis* é cultivado *in vitro* por longos períodos observa-se uma diminuição de sua virulência, entretanto, quando o fungo é passado por uma cultura de macrófagos, essa virulência pode ser recuperada (Brummer *et al.*, 1990; Svidzinski *et al.*, 1999). De acordo com Kashino *et al* (1990) após 64 meses de cultivo *in vitro*, *P. brasiliensis* pode chegar a perder sua letalidade infectando camundongos susceptíveis a PCM, entretanto, quando o fungo é recuperado após alguns ciclos de infecção em camundongos pode voltar a ser tão virulento quanto seu isolado original (Kashino *et al.*, 1990).

Baseando nas observações de que certos fungos dimórficos podem aumentar sua virulência após serem recuperados da interação com amebas de solo realizamos um ensaio para testar se *P. brasiliensis* apresenta essa mesma característica. Para isso, foram feitos seis ciclos de passagens seriadas do fungo em *A. castellanii* e posteriormente esse fungo recuperado foi inoculado em larvas de *G. mellonella* para uma curva de sobrevivência (figura 11). Para essa curva foram feitos dois controles, um deles corresponde ao inóculo do fungo não submetido pelos ciclos de passagens seriadas em *A. castellanii* e outro que corresponde a um inóculo apenas em PBS. Após 8 dias de observação ambos grupos de larvas inoculadas com os controles permaneceram 100% viáveis. Entretanto, após apenas um dia, a primeira larva do grupo infectado com *P. brasiliensis* que passou pelos ciclos de fagocitose por *A. castellanii* já havia morrido e após 8 dias esse número chegou a quase 50% das larvas desse grupo. Durante o experimento podemos observar uma crescente melanização das larvas no

decorrer da infecção. A melanização de *G. mellonella* é um importante processo da resposta imune desse inseto envolvido na defesa contra um grande número de patógenos. Esse processo destina-se em capturar patógenos invasores com a produção do pigmento resultando no escurecimento das larvas (Ratcliffe, 1985). Apesar de não termos acompanhado a sobrevivência das lagartas por mais tempo por problemas técnicos, a diferença na sobrevivência das que foram infectadas com o fungo que interagiu com as amebas se mostrou estatisticamente diferente da sobrevivência das lagartas que foram infectadas com o fungo controle. Esse experimento piloto nos sugere que a virulência das leveduras de *P. brasiliensis* pode ser influenciada pela sua interação com *A. castellanii*.

Ainda não está completamente elucidado como alguns microrganismos patogênicos aumentam a virulência após sua fagocitose por macrófagos ou amebas de solo e como essa virulência é atenuada após longo tempo de cultivo *in vitro*. Estudos indicam que fatores presentes no hospedeiro podem ter um importante papel selecionando variantes mais virulentas ou até induzindo modificações em leveduras de *P. brasiliensis* (Kashino *et al.*, 1990). Catrenich e Johnson (1988) apontam em seu trabalho que culturas com virulência atenuada de *Legionella pneumophila* podem conter misturas de células avirulentas e de crescimento rápido com células virulentas viáveis de crescimento lento. Quando uma cultura como essa infecta um hospedeiro as células virulentas podem ser selecionadas e quando recuperadas podem dar origem a uma cultura mais virulenta (Catrenich e Johnson, 1988). Experimentos como esse nos indicam que *P. brasiliensis* e outros microrganismos patogênicos podem ter sua virulência aumentada após a interação com amebas de solo. Isso nos sugere que *A. castellanii* e outras amebas de solo podem ser excelentes modelos para o estudo dos efeitos evolutivos na virulência de vários microrganismos. Além disso, sustentam a hipótese de que diversos fungos dimórficos mantem sua virulência naturalmente devido a interação com microrganismos predadores de solo.

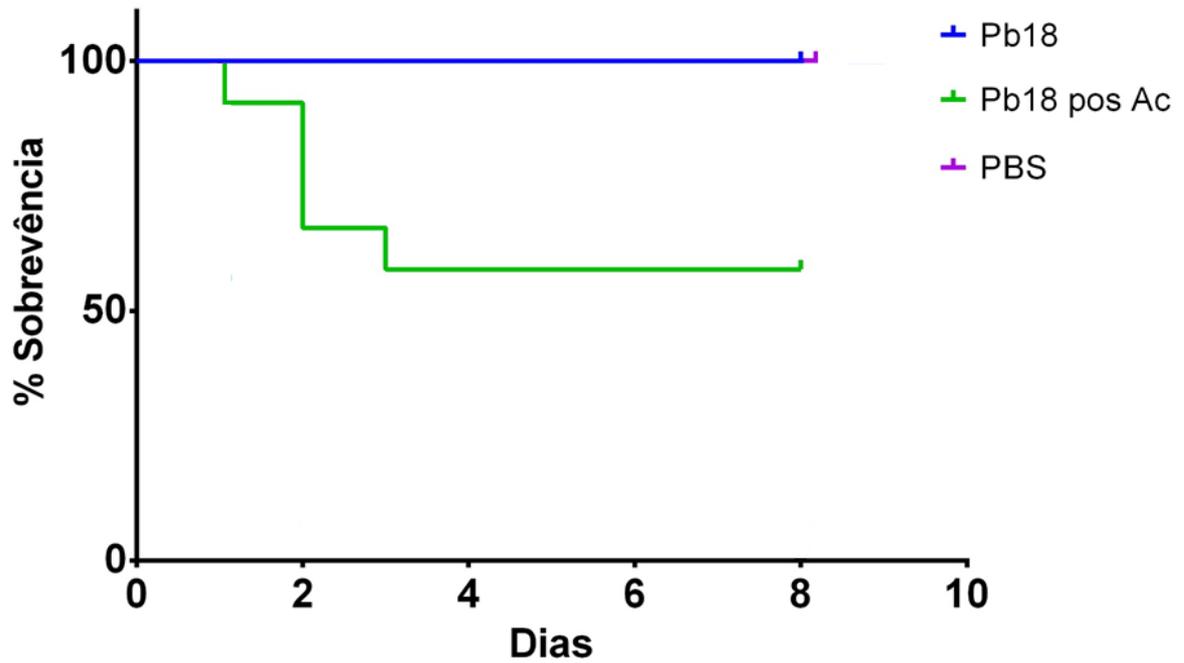


Figura 11. Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectada com *P. brasiliensis*.

P. brasiliensis foi recuperado após 6 ciclos de interação com *A. castellanii* e infectado em *G. mellonella* (Verde). Controles representam inóculo do fungo não cocultivado com *A. castellanii* (Azul) e inóculo apenas com PBS (Roxo). As larvas foram mantidas a 37°C e checadas a cada 24h.

5. Conclusões e Perspectivas

Embora não possamos dizer ao certo como e porque fatores de virulência que permitam a sobrevivência de fungos em hospedeiros mamíferos surgiram, é possível que esses fatores tenham aparecido e sido selecionado no contexto das interações do fungo com diversos organismos e/ou fatores ambientais. O surgimento de tais ferramentas provavelmente tornaram-se adaptativamente importantes à sobrevivência do fungo no seu habitat natural e assim foram selecionadas, e continuam a ser moldadas na interface da interação patógeno-hospedeiro que pode ter levado a uma coevolução tornando essa interação cada vez mais intrincada (Casadevall e Pirofski, 2007). O modelo de estudo escolhido com *A. castellanii* não reproduz todos os aspectos de uma infecção por um fungo no seu hospedeiro mamífero, mas aporta vários aspectos importantes incluindo o fato desse protozoário ser encontrado no ambiente natural do fungo (Mylonakis *et al.*, 2007).

Sabemos que a ameba de solo *A. castellanii* interage com leveduras de *P. brasiliensis* internalizando-as e digerindo-as e que o fungo não é capaz de destruir a ameba como faz com macrófagos em determinadas condições. Entretanto, sabemos que a ameba não é capaz de fagocitar o fungo quando esse se encontra na forma de micélio, o que pode servir como uma defesa já que *P. brasiliensis* é encontrado na forma de micélio à temperatura ambiente. Mas existem indícios que o fungo possa ser encontrado vivendo em populações heterogêneas contendo leveduras e micélios, principalmente em solos com temperaturas mais elevadas. Além disso nossos experimentos indicam que a presença de *A. castellanii* pode influenciar o dimorfismo de *P. brasiliensis* impedindo sua transição dimórfica de levedura para micélio, permitindo assim que a ameba se alimente do fungo.

Para podemos explicar como e porque fatores de virulência apareceram em *P. brasiliensis* muitos estudos ainda devem ser realizados. Sabemos que os conídios são as principais formas de propágulo do fungo e devemos realizar novos estudos envolvendo esse tipo morfológico do fungo. A levedura é muito modificada e diferente fisiologicamente e metabolicamente quando comparada com o conídio que talvez seria a forma do fungo que melhor interage com as amebas no solo. Outro aspecto importante é a existência de uma grande diversidade de diferentes isolados de *P. brasiliensis*, o que nos atrai a atenção por exemplo, para buscar testar nestes ensaios aqueles isolados encontrados em íntima associação com tatus, e outros animais.

Além disso, muitos tipos de ameba podem ser encontradas no solo. É possível que existam outras espécies ainda não estudadas que não consigam destruir o fungo. Todavia, a similaridade de interações entre amebas e macrófagos e a observação de que a virulência do fungo pode ser aumentada após a interação com a ameba nos dão fortes indícios de que esses protozoários possam ter um papel importante no aparecimento e na manutenção de fatores de virulência em *P. brasiliensis*.

6. Referências Bibliográficas

- Achterman, R.R., Smith, A.R., Oliver, B.G., White, T.C. (2011). Sequenced dermatophyte strains: growth rate, conidiation, drug susceptibilities, and virulence in an invertebrate model. *Fungal Genet Biol* 48, 335-341.
- Aksozek, A., McClellan, K., Howard, K., Niederkorn, J.Y., Alizadeh, H. (2002). Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. *J Parasitol* 88, 621-623.
- Alsam, S., Jeong, S.R., Sissons, J., Dudley, R., Kim, K.S., Khan, N.A. (2006). *Escherichia coli* interactions with *Acanthamoeba*: a symbiosis with environmental and clinical implications. *J Med Microbiol* 55, 689-694.
- Ameen, M., Talhari, C., Talhari, S. (2010). Advances in paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Dermatol* 35, 576-580.
- Anderson, I.J., Watkins, R.F., Samuelson, J., Spencer, D.F., Majoros, W.H., Gray, M.W., Loftus, B.J. (2005). Gene discovery in the *Acanthamoeba castellanii* genome. *Protist* 156, 203-214.
- Apidianakis, Y., Rahme, L.G., Heitman, J., Ausubel, F.M., Calderwood, S.B., Mylonakis, E. (2004). Challenge of *Drosophila melanogaster* with *Cryptococcus neoformans* and role of the innate immune response. *Eukaryot Cell* 3, 413-419.
- Bagagli, E., Franco, M., Bosco Sde, M., Hebelier-Barbosa, F., Trinca, L.A., Montenegro, M.R. (2003). High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol* 41, 217-223.
- Bagagli, E., Sano, A., Coelho, K.I., Alquati, S., Miyaji, M., De Camargo, Z.P., Gomes, G.M., Franco, M., Montenegro, M.R. (1998). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 58, 505-512.
- Bagagli, E., Theodoro, R.C., Bosco, S.M., McEwen, J.G. (2008). *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia* 165, 197-207.
- Barrozo, L.V., Mendes, R.P., Marques, S.A., Benard, G., Silva, M.E., Bagagli, E. (2009). Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. *Int J Epidemiol* 38, 1642-1649.
- Behnsen, J., Narang, P., Hasenberg, M., Gunzer, F., Bilitewski, U., Klippel, N., Rohde, M., Brock, M., Brakhage, A.A., Gunzer, M. (2007). Environmental dimensionality controls the interaction of phagocytes with the pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 3, e13.

- Bergin, D., Reeves, E.P., Renwick, J., Wientjes, F.B., Kavanagh, K. (2005). Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils. *Infect Immun* 73, 4161-4170.
- Bocca, A.L., Hayashi, E.E., Pinheiro, A.G., Furlanetto, A.B., Campanelli, A.P., Cunha, F.Q., Figueiredo, F. (1998). Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. *J Immunol* 161, 3056-3063.
- Boily, P. (2002). Individual variation in metabolic traits of wild nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and the aerobic capacity model for the evolution of endothermy. *J Exp Biol* 205, 3207-3214.
- Borges-Walmsley, M.I., Chen, D., Shu, X., Walmsley, A.R. (2002). The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol* 10, 80-87.
- Borges-Walmsley, M.I., Walmsley, A.R. (2000). cAMP signalling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity. *Trends Microbiol* 8, 133-141.
- Brakhage, A.A., Bruns, S., Thywissen, A., Zipfel, P.F., Behnsen, J. (2010). Interaction of phagocytes with filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* 13, 409-415.
- Brieland, J.K., Fantone, J.C., Remick, D.G., Legendre, M., McClain, M., Engleberg, N.C. (1997). The role of *Legionella pneumophila*-infected *Hartmannella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of Legionnaire's disease. *Infect Immun* 65, 5330-5333.
- Brummer, E., Castaneda, E., Restrepo, A. (1993). *Paracoccidioidomycosis*: an update. *Clin Microbiol Rev* 6, 89-117.
- Brummer, E., Hanson, L.H., Restrepo, A., Stevens, D.A. (1989). Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect Immun* 57, 2289-2294.
- Brummer, E., Restrepo, A., Hanson, L.H., Stevens, D.A. (1990). Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: the influence of in vitro passage and storage. *Mycopathologia* 109, 13-17.
- Buissa-Filho, R., Puccia, R., Marques, A.F., Pinto, F.A., Munoz, J.E., Nosanchuk, J.D., Travassos, L.R., Taborda, C.P. (2008). The monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* mediates immune protection in infected BALB/c mice challenged intratracheally with the fungus. *Infect Immun* 76, 3321-3328.
- Calich, V.L., Vaz, C.A., Burger, E. (1998). Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Res Immunol* 149, 407-417; discussion 499-500.
- Casadevall, A. (2012). Fungi and the rise of mammals. *PLoS Pathog* 8, e1002808.

- Casadevall, A., Pirofski, L. (2001). Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis* 184, 337-344.
- Casadevall, A., Pirofski, L.A. (2007). Accidental virulence, cryptic pathogenesis, martians, lost hosts, and the pathogenicity of environmental microbes. *Eukaryot Cell* 6, 2169-2174.
- Casadevall, A., Steenbergen, J.N., Nosanchuk, J.D. (2003). 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi--the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Curr Opin Microbiol* 6, 332-337.
- Catrenich, C.E., Johnson, W. (1988). Virulence conversion of *Legionella pneumophila*: a one-way phenomenon. *Infect Immun* 56, 3121-3125.
- Corredor, G.G., Castano, J.H., Peralta, L.A., Diez, S., Arango, M., Mcewen, J., Restrepo, A. (1999). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Rev Iberoam Micol* 16, 216-220.
- Costa, T.A., Bazan, S.B., Feriotti, C., Araujo, E.F., Bassi, E., Loures, F.V., Calich, V.L. (2013). In pulmonary paracoccidioidomycosis IL-10 deficiency leads to increased immunity and regressive infection without enhancing tissue pathology. *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2512.
- Coutinho, Z.F., Silva, D., Lazera, M., Petri, V., Oliveira, R.M., Sabroza, P.C., Wanke, B. (2002). Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica* 18, 1441-1454.
- Cytrynska, M., Mak, P., Zdybicka-Barabas, A., Suder, P., Jakubowicz, T. (2007). Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides* 28, 533-546.
- De Jonckheere, J.F. (1991). Ecology of *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis* 13 Suppl 5, S385-387.
- Desjardins, C.A., Champion, M.D., Holder, J.W., Muszewska, A., Goldberg, J., Bailao, A.M., Brigido, M.M., Ferreira, M.E., Garcia, A.M., Grynberg, M., Gujja, S., Heiman, D.I., Henn, M.R., Kodira, C.D., Leon-Narvaez, H., Longo, L.V., Ma, L.J., Malavazi, I., Matsuo, A.L., Morais, F.V., Pereira, M., Rodriguez-Brito, S., Sakthikumar, S., Saleem-Izacc, S.M., Sykes, S.M., Teixeira, M.M., Vallejo, M.C., Walter, M.E., Yandava, C., Young, S., Zeng, Q., Zucker, J., Felipe, M.S., Goldman, G.H., Haas, B.J., Mcewen, J.G., Nino-Vega, G., Puccia, R., San-Blas, G., Soares, C.M., Birren, B.W., Cuomo, C.A. (2011). Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. *PLoS Genet* 7, e1002345.
- Dykova, I., Lom, J., Schroeder-Diedrich, J.M., Booton, G.C., Byers, T.J. (1999). *Acanthamoeba* strains isolated from organs of freshwater fishes. *J Parasitol* 85, 1106-1113.

- Feldmesser, M., Kress, Y., Novikoff, P., Casadevall, A. (2000). *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect Immun* 68, 4225-4237.
- Ferreira, K.S., Lopes, J.D., Almeida, S.R. (2003). Regulation of T helper cell differentiation in vivo by GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* provided by different antigen-presenting cells. *Scand J Immunol* 58, 290-297.
- Fields, B.S., Shotts, E.B., Jr., Feeley, J.C., Gorman, G.W., Martin, W.T. (1984). Proliferation of *Legionella pneumophila* as an intracellular parasite of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Appl Environ Microbiol* 47, 467-471.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497-509.
- Franco, M. (1987). Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 25, 5-18.
- Franco, M., Bagagli, E., Scapolio, S., Da Silva Lacaz, C. (2000). A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med Mycol* 38, 185-191.
- Franzot, S.P., Fries, B.C., Cleare, W., Casadevall, A. (1998). Genetic relationship between *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* strains of serotypes A and D. *J Clin Microbiol* 36, 2200-2204.
- Fuchs, B.B., Eby, J., Nobile, C.J., El Khoury, J.B., Mitchell, A.P., Mylonakis, E. (2010). Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. *Microbes Infect* 12, 488-496.
- Garate, M., Cao, Z., Bateman, E., Panjwani, N. (2004). Cloning and characterization of a novel mannose-binding protein of *Acanthamoeba*. *J Biol Chem* 279, 29849-29856.
- Garcia-Solache, M.A., Izquierdo-Garcia, D., Smith, C., Bergman, A., Casadevall, A. (2013). Fungal virulence in a lepidopteran model is an emergent property with deterministic features. *MBio* 4, e00100-00113.
- Gomes-Rezende, J.A., Gomes-Alves, A.G., Menino, J.F., Coelho, M.A., Ludovico, P., Goncalves, P., Sturme, M.H., Rodrigues, F. (2012). Functionality of the *Paracoccidioides* mating alpha-pheromone-receptor system. *PLoS One* 7, e47033.
- Greub, G., Raoult, D. (2004). Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 17, 413-433.
- Jacobson, E.S., Emery, H.S. (1991). Catecholamine uptake, melanization, and oxygen toxicity in *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol* 173, 401-403.
- Jarrell, K.F., Kropinski, A.M. (1982). The virulence of protease and cell surface mutants of *Pseudomonas aeruginosa* for the larvae of *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol* 39, 395-400.

- Kashino, S.S., Singer-Vermes, L.M., Calich, V.L., Burger, E. (1990). Alterations in the pathogenicity of one *Paracoccidioides brasiliensis* isolate do not correlate with its in vitro growth. *Mycopathologia* 111, 173-180.
- Kavanagh, K., Reeves, E.P. (2004). Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 28, 101-112.
- Khan, N.A. (2006). Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev* 30, 564-595.
- Kurokawa, C.S., Sugizaki, M.F., Peracoli, M.T. (1998). Virulence factors in fungi of systemic mycoses. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 40, 125-135.
- Leclerc, M.C., Philippe, H., Gueho, E. (1994). Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J Med Vet Mycol* 32, 331-341.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.
- Levitz, S.M., Dibenedetto, D.J., Diamond, R.D. (1987). A rapid fluorescent assay to distinguish attached from phagocytized yeast particles. *J Immunol Methods* 101, 37-42.
- Madrigal Sesma, M.J. (1988). [Isolation of free-living amoebae, potentially pathogenic for humans, from 3 species of saurians from the western Canary Islands]. *Rev Sanid Hig Publica (Madr)* 62, 1405-1409.
- Marciano-Cabral, F., Cabral, G. (2003). Acanthamoeba spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 16, 273-307.
- Martinez, A.J., Garcia, C.A., Halks-Miller, M., Arce-Vela, R. (1980). Granulomatous amebic encephalitis presenting as a cerebral mass lesion. *Acta Neuropathol* 51, 85-91.
- Matute, D.R., Mcewen, J.G., Puccia, R., Montes, B.A., San-Blas, G., Bagagli, E., Rauscher, J.T., Restrepo, A., Morais, F., Nino-Vega, G., Taylor, J.W. (2006). Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* 23, 65-73.
- Mazur, T., Hadas, E. (1994). The effect of the passages of Acanthamoeba strains through mice tissues on their virulence and its biochemical markers. *Parasitol Res* 80, 431-434.
- Mcewen, J.G., Garcia, A.M., Ortiz, B.L., Botero, S., Restrepo, A. (1995). In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res* 26, 305-306.

- Mendes-Giannini, M.J., Hanna, S.A., Da Silva, J.L., Andreotti, P.F., Vincenzi, L.R., Benard, G., Lenzi, H.L., Soares, C.P. (2004). Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. *Microbes Infect* 6, 882-891.
- Mendes-Giannini, M.J., Moraes, R.A., Ricci, T.A. (1990). Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 32, 384-385.
- Mergeryan, H. (1991). The prevalence of *Acanthamoeba* in the human environment. *Rev Infect Dis* 13 Suppl 5, S390-391.
- Mietz, H., Font, R.L. (1997). *Acanthamoeba* keratitis with granulomatous reaction involving the stroma and anterior chamber. *Arch Ophthalmol* 115, 259-263.
- Morejon, K.M., Machado, A.A., Martinez, R. (2009). Paracoccidioidomycosis in patients infected with and not infected with human immunodeficiency virus: a case-control study. *Am J Trop Med Hyg* 80, 359-366.
- Moscardi-Bacchi, M., Brummer, E., Stevens, D.A. (1994). Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. *J Med Microbiol* 40, 159-164.
- Muranski, P., Restifo, N.P. (2013). Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* 121, 2402-2414.
- Mylonakis, E., Ausubel, F.M., Perfect, J.R., Heitman, J., Calderwood, S.B. (2002). Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15675-15680.
- Mylonakis, E., Casadevall, A., Ausubel, F.M. (2007). Exploiting amoeboid and non-vertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi. *PLoS Pathog* 3, e101.
- Mylonakis, E., Moreno, R., El Khoury, J.B., Idnurm, A., Heitman, J., Calderwood, S.B., Ausubel, F.M., Diener, A. (2005). *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun* 73, 3842-3850.
- Nosanchuk, J.D., Casadevall, A. (2006). Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3519-3528.
- Patino, M.M., Burgos, L.C., Restrepo, A. (1984). Effect of temperature on the mycelium to yeast transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia* 22, 509-511.
- Pinzan, C.F., Ruas, L.P., Casabona-Fortunato, A.S., Carvalho, F.C., Roque-Barreira, M.C. (2010). Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PLoS One* 5, e10757.

- Pollard, T.D., Shelton, E., Weihing, R.R., Korn, E.D. (1970). Ultrastructural characterization of F-actin isolated from *Acanthamoeba castellanii* and identification of cytoplasmic filaments as F-actin by reaction with rabbit heavy meromyosin. *J Mol Biol* 50, 91-97.
- Prado, M., Silva, M.B., Laurenti, R., Travassos, L.R., Taborda, C.P. (2009). Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 513-521.
- Preston, T.M., King, C.A. (1984). Amoeboid locomotion of *Acanthamoeba castellanii* with special reference to cell-substratum interactions. *J Gen Microbiol* 130, 2317-2323.
- Puccia, R., Mcewen, J.G., Cisalpino, P.S. (2008). Diversity in *Paracoccidioides brasiliensis*. The PbGP43 gene as a genetic marker. *Mycopathologia* 165, 275-287.
- Purtilo, D.T., Walsh, G.P., Storrs, E.E., Gannon, C. (1975). The immune system of the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*, Linn). *Anat Rec* 181, 725-733.
- Ratcliffe, N.A. (1985). Invertebrate immunity--a primer for the non-specialist. *Immunol Lett* 10, 253-270.
- Reeves, E.P., Messina, C.G., Doyle, S., Kavanagh, K. (2004). Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia* 158, 73-79.
- Restrepo, A., Mcewen, J.G., Castaneda, E. (2001). The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol* 39, 233-241.
- Restrepo, A., Salazar, M.E., Cano, L.E., Stover, E.P., Feldman, D., Stevens, D.A. (1984). Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 46, 346-353.
- Rhodes, J.C., Howard, D.H. (1980). Isolation and characterization of arginine auxotrophs of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 27, 910-914.
- Richini-Pereira, V.B., Bosco Sde, M., Griese, J., Theodoro, R.C., Macoris, S.A., Da Silva, R.J., Barrozo, L., Tavares, P.M., Zancope-Oliveira, R.M., Bagagli, E. (2008). Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol* 46, 35-40.
- Richini-Pereira, V.B., Bosco Sde, M., Theodoro, R.C., Macoris, S.A., Bagagli, E. (2009). Molecular approaches for eco-epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 636-643.
- Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, I., Ramirez, E., Bonilla, P., Lares, F. (1987). Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *Environ Res* 42, 149-154.
- Roehm, N.W., Rodgers, G.H., Hatfield, S.M., Glasebrook, A.L. (1991). An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods* 142, 257-265.

- Salazar, M.E., Restrepo, A., Stevens, D.A. (1988). Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun* 56, 711-713.
- San-Blas, G., Nino-Vega, G., Iturriaga, T. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* 40, 225-242.
- San-Blas, G., Vernet, D. (1977). Induction of the synthesis of cell wall alpha-1,3-glucan in the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9 by fetal calf serum. *Infect Immun* 15, 897-902.
- Schuster, F.L., Visvesvara, G.S. (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 34, 1001-1027.
- Segal, G., Shuman, H.A. (1999). *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. *Infect Immun* 67, 2117-2124.
- Shankar, J., Restrepo, A., Clemons, K.V., Stevens, D.A. (2011). Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. *Clin Microbiol Rev* 24, 296-313.
- Siddiqui, R., Khan, N.A. (2012a). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors* 5, 6.
- Siddiqui, R., Khan, N.A. (2012b). War of the microbial worlds: who is the beneficiary in *Acanthamoeba*-bacterial interactions? *Exp Parasitol* 130, 311-313.
- Silva-Vergara, M.L., Martinez, R., Camargo, Z.P., Malta, M.H., Maffei, C.M., Chadu, J.B. (2000). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. *Med Mycol* 38, 193-199.
- Simoës, L.B., Marques, S.A., Bagagli, E. (2004). Distribution of paracoccidioidomycosis: determination of ecologic correlates through spatial analyses. *Med Mycol* 42, 517-523.
- Singer-Vermes, L.M., Burger, E., Franco, M.F., Di-Bacchi, M.M., Mendes-Giannini, M.J., Calich, V.L. (1989). Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *J Med Vet Mycol* 27, 71-82.
- Singer-Vermes, L.M., Ciavaglia, M.C., Kashino, S.S., Burger, E., Calich, V.L. (1992). The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 30, 261-264.
- Soares, C.M., Madlun, E.E., Da Silva, S.P., Pereira, M., Felipe, M.S. (1995). Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 33, 505-507.

- St Leger, R.J., Screen, S.E., Shams-Pirzadeh, B. (2000). Lack of host specialization in *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol* 66, 320-324.
- Steenbergen, J.N., Nosanchuk, J.D., Malliaris, S.D., Casadevall, A. (2003). *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*. *Infect Immun* 71, 4862-4872.
- Steenbergen, J.N., Nosanchuk, J.D., Malliaris, S.D., Casadevall, A. (2004). Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun* 72, 3478-3488.
- Steenbergen, J.N., Shuman, H.A., Casadevall, A. (2001). *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15245-15250.
- Straus, A.H., Freymuller, E., Travassos, L.R., Takahashi, H.K. (1996). Immunochemical and subcellular localization of the 43 kDa glycoprotein antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* with monoclonal antibodies. *J Med Vet Mycol* 34, 181-186.
- Svidzinski, T.I., Miranda Neto, M.H., Santana, R.G., Fischman, O., Colombo, A.L. (1999). *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 41, 279-283.
- Swanson, M.S., Hammer, B.K. (2000). *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol* 54, 567-613.
- Taborda, C.P., Juliano, M.A., Puccia, R., Franco, M., Travassos, L.R. (1998). Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. *Infect Immun* 66, 786-793.
- Teixeira Mde, M., Theodoro, R.C., Derengowski Lda, S., Nicola, A.M., Bagagli, E., Felipe, M.S. (2013). Molecular and morphological data support the existence of a sexual cycle in species of the genus *Paracoccidioides*. *Eukaryot Cell* 12, 380-389.
- Tercarioli, G.R., Bagagli, E., Reis, G.M., Theodoro, R.C., Bosco Sde, M., Macoris, S.A., Richini-Pereira, V.B. (2007). Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol* 7, 92.
- Theodoro, R.C., Teixeira Mde, M., Felipe, M.S., Paduan Kdos, S., Ribolla, P.M., San-Blas, G., Bagagli, E. (2012). Genus *paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. *PLoS One* 7, e37694.
- Thomaz, L., Apitz-Castro, R., Marques, A.F., Travassos, L.R., Taborda, C.P. (2008). Experimental *paracoccidioidomycosis*: alternative therapy with ajoene, compound from *Allium sativum*, associated with sulfamethoxazole/trimethoprim. *Med Mycol* 46, 113-118.

- Thomaz, L., Garcia-Rodas, R., Guimaraes, A.J., Tabora, C.P., Zaragoza, O., Nosanchuk, J.D. (2013). *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. *Virulence* 4, 139-146.
- Torres, I., Hernandez, O., Tamayo, D., Munoz, J.F., Leitao, N.P., Jr., Garcia, A.M., Restrepo, A., Puccia, R., Mcewen, J.G. (2013). Inhibition of PbGP43 expression may suggest that gp43 is a virulence factor in *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS One* 8, e68434.
- Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F., Ayadi, A. (2012). Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathol Biol (Paris)* 60, 399-405.
- Vicentini, A.P., Gesztesi, J.L., Franco, M.F., De Souza, W., De Moraes, J.Z., Travassos, L.R., Lopes, J.D. (1994). Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun* 62, 1465-1469.
- Vieira, G. D., Alves, T. C., Lima, S. M., Camargo, L. M., Sousa C. M. (2014). *Paracoccidioidomycosis* in a western Brazilian Amazon State: clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 47, 63-8.
- Visvesvara, G.S., Moura, H., Schuster, F.L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50, 1-26.
- Yoo, K.T., Jung, S.Y. (2012). Effects of mannose on pathogenesis of *Acanthamoeba castellanii*. *Korean J Parasitol* 50, 365-369.