



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

Caracterização da N-acetil- β -D-glicosaminidase de

Paracoccidioides brasiliensis.

CANDIDATA: MÔNICA DE OLIVEIRA SANTOS

ORIENTADORA: DRA. CÉLIA MARIA DE ALMEIDA SOARES

TESE APRESENTADA AO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO
EM PATOLOGIA MOLECULAR, DA
FACULDADE DE MEDICINA, DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
COMO REQUISITO PARCIAL À
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTOR EM PATOLOGIA
MOLECULAR.

BRASÍLIA – DF

2007

TESE DESENVOLVIDA NO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM PATOLOGIA MOLECULAR.

APOIO FINANCEIRO: CNPq / CAPES

*“Se seus sonhos estiverem nas nuvens, não
se preocupe, pois eles estão no lugar certo;
agora construa os alicerces.”*

Shakespeare

À minha família que me ajudou em todos os momentos desse trabalho, especialmente ao meu pai, Marcos, pelo apoio constante e exemplo de luta e perseverança.

À minha avó Claudia, com quem recebi grande exemplo de determinação, coragem, amor e perseverança.

À minha mãe... Sei que é apenas temporária a nossa separação e que, por mais longa que me possa parecer, a sua duração nada é em face da ditosa eternidade que Deus promete aos seus escolhidos. É doce e consoladora a certeza de que não há entre nós mais do que um véu material que nos oculta às minhas vistas! De que podes estar aqui ao meu lado, me ver e ouvir, de que não me esqueces, do mesmo modo que eu não te esqueço e de que os nossos pensamentos constantemente se entrecruzam e que o teu sempre me acompanha e ampara...

Ao Cláudio, por seu carinho, apoio e compreensão e por sua maravilhosa presença em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que em sua infinita bondade me presenteou com a *vida* e o *livre arbítrio*! Para que assim eu pudesse *crescer*... E que nas quedas me ajuda a levantar e seguir em frente...

À Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares por ser um exemplo de profissional dedicada e por exigir o melhor de seus alunos. Obrigado pela orientação e pela compreensão em tantas ocasiões difíceis.

À Profa. Dra. Rosália, pela amizade e apoio constante.

À Profa. Dra. Fabrícia, pela amizade, dedicação e auxílio na colaboração deste trabalho.

À Profa. Dra. Maristela, pelas sugestões e disposição na colaboração deste trabalho.

À Profa. Dra. Silvia, pela presença sempre amiga e bem humorada.

Ao Prof. Cirano, por sua amizade e constante auxílio.

Ao amigo Wesley por sua amizade, confiança e exemplo de amor à profissão.

À Tereza Cristina pela valorosa amizade e exemplo de força e determinação.

À Nádyá, obrigada por todo auxílio e por acreditar em mim e não me deixar desistir nos momentos mais difíceis... (você sabe).

À Bernadete, pelo sorriso fácil, pela bondade e amor que tem no coração. Sua amizade é um presente!

Ao amigo e irmão Bruno, por sua amizade incondicional e por tantos momentos incríveis que passamos juntos.

Ao Claytin, obrigado pela amizade, pela ajuda e pelos momentos de distração...

Ao Alexandre, pela constante e preciosa ajuda.

Ao Luiz Augusto, por compartilhar suas experiências.

Ao Rodrigo (Todinho) pela amizade e carinho (abraços fortes que quebram as costelas...).

À Mônica Santiago e Patrícia Kott, pela amizade, auxílio e troca de experiências durante todo esse tempo.

À Milce, pela amizade e carinho. Pelas palavras e exemplo que me fortaleceram nos momentos difíceis...

À Aline, pelo exemplo de força, amor e fé! Pelas constantes palavras de incentivo.

À Zildete, pelo carinho e exemplo de força e determinação.

Aos queridos amigos: Sabrina, Sarah, Lidiane, Kesser, Juliana Parente, Rogério, Renata, Daniela, Zilma, Fernanda Castro, Glaciane, Patrícia Zambuzzi, Karinne, Ronney, Kelly, Valdirene, Roberto, Gisele, Andrei e Eduardo, pela ajuda, amizade e pelos momentos de convivência sadia e agradável.

Um agradecimento em especial ao Tércio, por compartilhar sua experiência. Aos jovens: Yuri, Gabriela, Elisa Flávia, Mirelly, Lorena e Cristielly pela amizade, auxílio e momentos divertidos que passamos juntos.

Aos professores da Universidade de Federal de Goiás e da Universidade de Brasília, pela minha formação. Minha eterna gratidão.

E a todos que colaboraram para esta conquista, **MUITO OBRIGADA!**

ÍNDICE

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
I - INTRODUÇÃO	9
I.1 – O FUNGO <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	9
I.2 - ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE FUNGOS	22
II - JUSTIFICATIVA	28
III - OBJETIVOS	30
IV - RESULTADOS	32
V – ARTIGO	
Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the N-acetyl- β -D-glucosaminidase homologue of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .	33
VI – MANUSCRITO	
Characterization of the N-acetyl- β -D-glucosaminidase from <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> and its expression in <i>Escherichia coli</i> .	41
VII – DISCUSSÃO	67
VIII – BIBLIOGRAFIA	74

RESUMO

Um cDNA (*Pbnag*, nº de acesso GenBank AF 419158) codificante para N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado *Pb* 01 (ATCC MYA826) foi caracterizado e classificado como uma enzima pertencente à família 20 de glicosil hidrolase. *PbNAG* foi clonado em pGEX-4T3 e expresso em *Escherichia coli*. A análise em gel apresentou a presença de uma proteína de massa molecular estimada em 64,8 kDA. A proteína expressa foi purificada em resina glutationa-sepharose 4B e utilizada para produção de anticorpo policlonal. O anticorpo produzido anti-*PbNAG* apresentou reação com a proteína nativa, em extrato total, de micélio e levedura de *P. brasiliensis*. Na imunocitocalização o anticorpo anti-*PbNAG* reagiu com a proteína NAG nativa presente na parede de células leveduriformes *P. brasiliensis*. A enzima recombinante *PbNAG* foi caracterizada apresentando afinidade pelo substrato ρ -nitrofenil- β -D-N-acetilglucosamina (ρ NP-GlcNAc), com K_m de 0.112 mM, V_{max} de 0.0017 mM min⁻¹ mg proteína⁻¹, temperatura ótima de 37°C e pH ótimo de 4.4. A enzima foi pouco inibida por glicose e apresentou inibição por glicosamina, N-acetilglicosamina. Os estudos mostram que *PbNAG* está presente na parede celular de células leveduriformes de *P. brasiliensis*, sugerindo seu papel no metabolismo da parede fúngica.

PALAVRAS CHAVE: *Paracoccidioides brasiliensis*, N-acetil- β -D-glicosaminidase, parede celular.

ABSTRACT

The full-length cDNA *Pbnag* encoding a N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) GeneBank accession number AF 419158 of *Paracoccidioides brasiliensis* was characterized and classified as a NAG belonging to the glycosyl hydrolase family 20. The *PbNAG* was expressed in *Escherichia coli* and purified to homogeneity by affinity chromatography on glutathione-Sepharose 4B. SDS-PAGE analysis revealed the presence of one protein species with molecular mass estimated of 64.8 kDa. Immunoelectron microscopy demonstrated the presence of the native protein in the cell wall of *P. brasiliensis*. The recombinant protein was evaluated regarding to its kinetics properties. The K_m and V_{max} values for the enzyme using p -nitrophenyl- β -D-N-acetylglucosamine (p NP-GlcNAc) as substrate, were 0.112 mM and 0.0017 mM, respectively. The pH optimum for the enzyme was 4.4 and maximum activity was obtained at 37 °C. The enzyme activity was poorly affected by glucose and was inhibited by glucosamine, N-acetylglucosaminide. The studies show that *PbNAG* is present in the cell wall of yeast cells of *P. brasiliensis* suggesting its potential role in the fungal cell wall additionally.

KEYWORDS: *Paracoccidioides brasiliensis*, N-acetyl- β -D-glucosaminidase, cell wall.

I. INTRODUÇÃO

I.1 - O FUNGO *Paracoccidioides brasiliensis*

I. 1.1 - ASPECTOS GERAIS

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo dimórfico e agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica geograficamente restrita a América Latina (**Restrepo & Tobón, 2005**), ocorrendo principalmente no Brasil, predominantemente nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do país (**Camargo et al., 2000**). Este fungo cresce como levedura nos tecidos infectados ou quando cultivado *in vitro* à 36°C, e como forma miceliana (infectiva) em condições saprobióticas no meio ambiente, ou quando cultivado em temperaturas inferiores a 28°C (**Bagagli et al., 2006**). As leveduras de *P. brasiliensis* são caracterizadas por apresentarem brotamentos múltiplos, formados pela evaginação da célula-mãe, onde uma célula central é circundada por várias células periféricas, conferindo um aspecto de uma roda de leme de navio. A forma miceliana pode ser identificada por filamentos septados com conídeos terminais ou intercalares (**Queiroz-Telles, 1994; Restrepo-Moreno, 2003**).

I.1.2 – O HABITAT DE *P. brasiliensis*

Embora *P. brasiliensis* tenha sido isolado no solo, no trato digestivo e nas fezes de alguns animais, como morcegos frutívoros, tatus e pingüins, seu habitat natural ainda permanece desconhecido (**Lacaz et al., 1994; Bagagli et al., 2006**). Diversos autores têm relatado as características do microambiente onde a PCM é endêmica, o que inclui temperaturas entre 17 e 24°C, ventos, precipitação média anual de 500 a 2500 mm; proximidades de cursos d'água, lodo fértil e solos ácidos (**Restrepo et al., 1985; Montenegro et al., 1994**). O fungo já foi isolado do solo no Brasil (**Shome e Batista, 1963**), na Argentina (**Negroni, 1966**) e na Venezuela (**Albornoz, 1971**); também foi isolado de ração de cães, provavelmente contaminada com solo (**Ferreira et al., 1990**); do trato intestinal de morcego, *Artibeus lituratus* (**Grose e Tramsitt, 1965**); de fezes de Pinguim, *Pygoscelis adeliae* (**Gezuele, 1989**); de macaco, *Saimiri sciureus* (**Johsson e Lang, 1977**) de cães (**Ricci et al., 2004**) de duas espécies de tatus, o *Dasypus novemcintus* e o *Cabassou centralis* (**Corredor et al., 2005**).

O nincho ecológico exato de *P. brasiliensis*, ainda não está bem definido. No entanto, algumas hipóteses são propostas. Acredita-se que o fungo viva na natureza, em ambientes de água fresca, tais como rios ou córregos. Outra hipótese propõe que o fungo viva saprobioticamente e de forma temporária no solo. Reforçando essa hipótese, o fungo foi isolado de duas espécies de tatus, o *Dasypus novemcintus* e o *Cabassou centralis* (**Corredor et al., 2005**). Ainda não se sabe ao certo, se o fungo apresenta um hospedeiro intermediário. O fato dos animais serem acometidos pela doença caracteriza-os como hospedeiro acidental e não devem ser considerados reservatórios naturais do fungo (**Conti Días, 2007**).

I.1.3. - O FUNGO *P. brasiliensis* E A PARACOCCIDIOIDOMICOSE

A Paracoccidiodomicose (PCM) é uma micose sistêmica e endêmica de distribuição geográfica limitada a América Latina, com maior incidência no Brasil, Venezuela, Colômbia, Equador e Argentina (**Brummer *et al.*, 1993; Negroni *et al.*, 1993; Silvestre *et al.*, 1997**). A PCM, causada pelo fungo dimórfico *P. brasiliensis*, atinge predominantemente trabalhadores rurais, de sexo masculino, em idade entre 30 e 50 anos, (**Svidzinski *et al.*, 1999; Villa *et al.*, 2000**) que vivem nos países endêmicos das Américas do Sul e Central (**Villa *et al.*, 2000**).

Na natureza, freqüentemente os fungos dimórficos, como *P. brasiliensis*, ocorrem na forma miceliana (**Kurokawa *et al.*, 1998**). Esta forma induz a produção de artroconídeos (**Restrepo, 1985;**), pequenos propágulos, que são formas infectantes (**San-Blas & San-Blas, 1977**). Em *P. brasiliensis* os conídios podem medir de 3 a 20 µm de diâmetro e são capazes de se estabelecer no tecido pulmonar (**Restrepo, 1985**). Após a penetração nas células, *P. brasiliensis* converte-se para sua fase leveduriforme, processo fundamental para o sucesso no estabelecimento da infecção (**Brummer *et al.*, 1993; Camargo *et al.*, 2000**).

As manifestações clínicas da PCM são diversas, podendo apresentar desde lesões pulmonares assintomáticas até infecções generalizadas. Independentemente do órgão afetado a PCM usualmente é associada à formação de fibrose, o que pode interferir permanentemente com a qualidade de vida dos pacientes (**Tobón *et al.*, 2003**). O grande número de tecidos que *P. brasiliensis* pode colonizar e infectar sugere que, o fungo deve ter desenvolvido mecanismos que o capacitam a aderir, extravasar e invadir barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro (**Mendes-Giannini *et al.*, 1994; Lenzi *et al.*, 2000**).

A forma juvenil (aguda ou subaguda) representa 3 a 5% dos casos descritos da doença, sendo a maioria dos pacientes constituídos por crianças ou adultos jovens (**Brummer *et al.*, 1993**). A doença caracteriza-se por um desenvolvimento rápido e por marcante envolvimento de órgãos, linfonodos e medula óssea. A função imune mediada por células é gravemente deprimida nesses pacientes, provavelmente devido ao comprometimento medular (**Londero e Melo 1983; Brummer *et al.*, 1993**).

A forma crônica ou adulta ocorre em mais de 90% dos casos, acometendo, na maioria dos casos, homens adultos. Ao contrário da forma aguda, o quadro clínico apresenta um desenvolvimento lento com comprometimento pulmonar evidente (**Brummer *et al.*, 1993**). Em aproximadamente 25% dos casos, o pulmão é o único órgão afetado (forma unifocal). Muitas vezes, com o desenvolvimento silencioso da doença, o paciente busca auxílio médico somente quando apresenta sintomas de comprometimento extrapulmonar. Nestes casos se constatam o envolvimento de órgãos como pele, mucosas das vias aéreas superiores, tubo digestivo e linfonodos (forma multifocal) (**Londero, 1986; Franco *et al.*, 1989**);). As lesões pulmonares são nodulares, infiltrativas ou fibróticas; verifica-se comprometimento bilateral e localização das lesões nas porções central e baixa do pulmão, com o ápice livre da doença (**Restrepo *et al.*, 1976; Londero e Ramos, 1990**). Os sintomas são heterogêneos e frequentemente, ocorrem lesões nas mucosas orais e nasais, pele, gânglios linfáticos e adrenais. Menos freqüentemente, pode ocorrer envolvimento ocular, comprometimento dos sistemas nervoso e vascular, destruição óssea. O envolvimento da glândula tireóide também é raro (**Franco *et al.*, 1989; Londero *et al.*, 1990**).

I.1.4 - DIMORFISMO DE *P. brasiliensis*

Alguns microorganismos utilizam o dimorfismo como uma resposta de defesa e adaptação a alterações ambientais. Trata-se de uma característica fúngica que depende da alteração da temperatura e/ou fontes de nutrientes. Esse fator favorece a instalação do fungo no tecido auxiliando sua invasão no organismo (**Villar *et al.*, 1988**). Em *P. brasiliensis* a transição de micélio para levedura é um requerimento essencial para a ocorrência da PCM (**San-Blas, 2002**). *P. brasiliensis* cresce na forma de micélio, forma infectante, a 23°C-26°C e como levedura a 35°C-37°C nos tecidos do hospedeiro (**Kanetsuna *et al.*, 1972**). A diferenciação celular de *P. brasiliensis* pode ser obtida “*in vitro*”, apenas pela alteração da temperatura de incubação. A diferenciação celular de uma forma para outra é lenta e gradual. Experimentos de diferenciação celular com o isolado *Pb 01* de *P. brasiliensis* evidenciaram que, ao final de 18-20 dias, cerca de 95% das formas micelianas se diferenciaram em leveduriformes, enquanto que o processo reverso, se completa 15 dias após o início da incubação (**Silva *et al.*, 1994; Mattar-Filho *et al.*, 1997**).

A transição de levedura para micélio é caracterizada “*in vitro*”, pela formação de brotos alongados, multinucleados, em forma de pêra, os quais, gradativamente vão assumindo o aspecto de hifa normal a partir do ápice da célula alongada (**Bartinick-Garcia *et al.*, 1995**). Na diferenciação, “*in vitro*”, de micélio para levedura, surgem estruturas arredondadas a partir do espessamento de algumas regiões interceptais das hifas. No final da diferenciação celular, as leveduras se dividem por brotamento e a cultura já se encontra predominantemente leveduriforme (**San-Blas, 1992**).

O dimorfismo de fungos está relacionado à alterações de componentes da parede celular (**Borba e Schäffer, 2002**). Em *P. brasiliensis* a diferenciação morfológica é conseqüência de um conjunto de

alterações bioquímicas e fisiológicas desencadeadas pelo aumento de temperatura, a qual uma estimula uma adaptação no padrão transcricional e ou regulatório em geral de genes e proteínas (**Nunes et al., 2006; Bastos et al., 2007**). Na forma miceliana de *P. brasiliensis* há o predomínio da β -1,3 glucana, enquanto que, na forma leveduriforme a α -1,3 glucana é predominante. Estudos realizados com isolados de *P. brasiliensis* sugerem que a α -1,3 glucana protege o fungo contra o ataque de enzimas fagocitárias de leucócitos e macrófagos (**San-Blas & San-Blas, 1977; Kurokawa et al., 1998**). **San-Blas, (1981)** sugere que fagócitos humanos poderiam produzir β -glucanase com a capacidade de digerir somente β -1,3 glucana, presente na parede celular da forma miceliana dos fungos. A diferenciação do fungo para a forma leveduriforme começaria a infecção prevenindo a ação das enzimas fagocitárias, causando o parasitismo de *P. brasiliensis*.

Outro fator que tem sido relatado como relacionado ao dimorfismo de *P. brasiliensis* é a presença do hormônio feminino 17- β -estradiol. Pesquisas sobre a ação de hormônios esteróides em *P. brasiliensis*, mostraram que o hormônio 17- β -Estradiol inibe a transição de micélio para levedura de maneira dose-dependente (**Restrepo et al., 1984; Sano et al., 1999**). Antes da puberdade a infecção ocorre com a mesma frequência nos sexos masculino e feminino, o que sugere a ação desses hormônios esteróides (**Stover et al., 1986**). O hormônio feminino, 17- β -Estradiol, induz alterações no perfil de síntese protéica em *P. brasiliensis*. Tem sido sugerido que uma proteína citoplasmática receptora do hormônio, denominada EBP (Estradiol Binding Protein), interage seletivamente com estrogênios (**Clemons et al., 1989**). Estrógenos naturais, como estradiol, inibem *in vitro* a transição de micélio ou conídio para levedura. **Aristizabal et al. (1998)** demonstraram que em camundongos machos e fêmeas

BALB/c, infectados intranasalmente, a transição de conídios para leveduras ocorreu entre 24 h a 96 h, com unidades formadoras de colônias e células leveduriformes aumentando subseqüentemente nos machos e enquanto nas fêmeas BALB/c a transição de micélio ou conídio para levedura, não ocorreu. **Sano *et al.* (1999)** observaram que a transição de micélio para levedura, *in vivo*, é inibida em nível significativamente maior nas fêmeas do que nos ratos machos, em presença de 17- β -Estradiol, enquanto na presença de progesterona e testosterona não foi observada qualquer inibição, demonstrando a ação do hormônio 17- β -Estradiol na inibição de *P. brasiliensis*.

I.1.5 - PAREDE CELULAR DE *P. brasiliensis*

Os fungos são recobertos por uma parede rígida que recobre a célula protegendo-a contra variações osmóticas, químicas e biológicas. A parede possui ação de “filtro” permitindo a passagem de algumas moléculas e excluindo outras, desempenhando importante papel no crescimento, desenvolvimento e interações dos fungos com o ambiente e com outras células (**Peberdy *et al.*, 1990; Ruiz-Herrera *et al.*, 1992; Bulawa *et al.*, 1993**). A parede celular está envolvida com a morfogênese, expressão antigênica, adesão e interação célula-célula. Além disso, a parede mantém a forma da célula. Embora, a parede celular seja rígida e pareça estática, ela está freqüentemente sofrendo remodelamento, mudando assim sua estrutura e composição durante o crescimento e desenvolvimento da célula (**Peberdy *et al.*, 1990; Sentandreu *et al.*, 1992; Ruiz-Herrera *et al.*, 1992; Bulawa *et al.*, 1993**).

Os principais constituintes da parede celular de fungos são polissacarídeos (quitina e α e β -glucanas), proteínas, algumas altamente

glicosiladas, e lipídeos (**de Groot et al., 2005**). Estes componentes estão distribuídos diferencialmente ao longo da parede celular (**Kanetsuna et al., 1972; San-Blas, 1977**).

A quitina é um homopolímero, linear, insolúvel, formado por unidades de N-acetil- β (1-4)-D-glicosamina (GlcNAc), sendo um importante componente estrutural encontrado em integumentos de crustáceos, exoesqueleto de insetos e paredes de fungos (**Escott et al., 1998**). A quantidade de quitina e a sua distribuição na parede celular variam entre os diferentes fungos, fator que parece influenciar na regulação dos tipos de quitinases produzidas pelo parasita (**Escott et al., 1998**). De modo geral os fungos produzem quitinases com papéis relacionados com a divisão celular em leveduras, alguns processos morfogênicos em micélios, incluindo germinação de esporos, ramificação e autólise (**Gooday et al., 1992; Escott et al., 1998**).

Em *P. brasiliensis* a quitina é encontrada em maior quantidade na fase leveduriforme (44%) do que em micélio (25%) (**Moreno et al., 1972; Kanetsuna et al., 1972**). Esse fato sugere o papel do polissacarídeo na morfologia e dimorfismo e conseqüentemente, o papel da parede na diferenciação celular (**Kanetsuna et al., 1969**). Na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* a quitina corresponde à camada interna da parede celular, abaixo da camada externa formada de α -1,3 glucanas (83%), enquanto que as pequenas frações existentes de β -1,3 glucanas (17%) estão localizadas em sítios discretos, distribuídos ao longo da parede celular (**Carbonel, 1969**). Em micélio a quitina, β -1,3 glucanas e proteínas encontram-se associadas à única camada da parede celular (**Kanetsuna et al., 1972**).

As glucanas estão envolvidas no estabelecimento da forma em *P. brasiliensis*. (**San-Blas & San-Blas, 1985**). A estrutura arredondada da levedura é conferida pela síntese simultânea da parede celular total e a forma cilíndrica apresentada pelos brotamentos e hifas é produzida quando

a síntese de glucanas é limitada ao topo da hifa. Durante o processo de diferenciação de células micelianas em leveduriformes ocorre aumento da síntese de α -1,3 glucanas (**Kanetsuna et al., 1972**) e no processo inverso, levedura para micélio, são sintetizadas β -1,3 glucanas, β -1,6 glucanas (em menor quantidade), outros polissacarídeos e proteínas ligadas por pontes dissulfeto que, em conjunto, promovem o crescimento de hifas, a partir de protuberâncias originadas na superfície da levedura (**Kanetsuna et al., 1981**).

A presença de moléculas de α -1,3 glucanas em fungos patogênicos, como *P. brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis*, tem sido descrita como um dos possíveis fatores determinantes de virulência destes patógenos (**San-Blas & San-Blas, 1977; San-Blas 1992; Bulawa et al., 1993; Maresca et al., 1994**). Em *H. capsulatum*, cepas contendo o gene que codifica para a α -1,3 glucana sintase deletado tiveram sua virulência atenuada (**Rappleye et al., 2004**). Nesse fungo, foi demonstrado que a α -1,3 glucana localiza-se na camada mais externa da parede recobrando a camada de β -1,3 glucana, o que bloqueia a ligação da dectina-1 aos receptores existentes nas de β -1,3 glucanas; esse fator reduz a eficácia da resposta imune em camundongos (**Rappleye et al., 2007**).

Enzimas tem sido descritas com envolvimento na morfogênese, expressão antigênica e adesão em fungos. Segundo **Ganiko et al., (2007)**, uma lecitina de *P. brasiliensis* conhecida como paracoccina foi capaz de interagir com a quitina da parede celular do fungo. Anticorpos reativos com essa proteína foram capazes de reduzir o crescimento do fungo “*in vitro*”, que apresentou colônias menores e células menos agregadas que as células controle. A presença destes anticorpos alterou o padrão de distribuição da quitina na parede celular do fungo, sugerindo que a interação da

paracoccina com a quitina é um evento importante na organização da parede e do crescimento do fungo.

Em *P. brasiliensis*, poucas proteínas associadas à parede celular foram descritas tais como: duas adesinas com 19 e 32 kDa (**Gonzalez et al., 2005**), uma gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (**Barbosa et al., 2006**) e gp43 (**Vicentini et al., 1994**), todas com capacidade de ligação com componentes da matriz extracelular, além de uma chaperonina mitocondrial PbDnaJ1 (**Batista et al., 2006**) e melanina (**Silva et al., 2006**).

Em *P. brasiliensis* já foram identificados genes codificantes para 4 quitina sintases (**Niño-vega et al., 2000**). Em *C. albicans* existem 4 genes codificantes para quitina sintases, sendo um deles essencial (**Munro et al., 2001**).

I.2 - ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE FUNGOS

I.2.1 – CONCEITOS E FUNÇÕES

Os fungos secretam algumas enzimas hidrolíticas como proteinases, quitinases, N-acetilglicosaminidases, lipases e fosfolipases em meios de cultura. Essas enzimas apresentam um papel essencial no metabolismo fúngico. Podem estar envolvidas na biossíntese e remodelação da parede durante o crescimento e divisão celulares, e em eventos morfo genéticos de fungos (**Nombela *et al.*, 1988; Kurokawa *et al.*, 1998; Adams, 2004**).

Proteinases extracelulares podem ter papel na aderência e sobrevivência de patógenos em invasão de células e tecidos e digestão de imunoglobulinas (**Kurokawa *et al.*, 1998**). A produção de proteinases por fungos patogênicos tem sido reconhecida como um fator importante de virulência (**Adam *et al.*, 1996; Kurokawa *et al.*, 1998**) e como alvo para o desenvolvimento de vacinas e drogas (**Wu *et al.*, 2001**).

As enzimas do sistema quitinolítico (EC 3.2.1.) são classificadas como glicosil hidrolases, e compreendem cerca de 86 famílias de enzimas descritas, sendo sua ação associada com a catálise e degradação da quitina, um polímero insolúvel, linear, formado por unidades de N-acetilglicosamina unidas por ligação β -1,4. As enzimas do sistema quitinolítico estão presentes na maioria dos organismos, incluindo aqueles que não contêm quitina, como bactérias, vírus, plantas e animais superiores desempenhando importantes papéis fisiológicos e ecológicos (**Watanabe *et al.*, 1999**).

As enzimas que formam o sistema quitinolítico são classificadas atualmente em duas grandes categorias: endoquitinases (EC 3.2.1.14) que clivam a quitina aleatoriamente em sítios internos, gerando produtos de

baixa massa molecular como quitotetraoses, quitotrioses, e diacetilquitobioses e as exoquitinases que são divididas em duas subcategorias: quitobiosidases (EC 3.2.1.29) que catalisam diacetilquitobioses e N-acetil- β -D-glicosaminidases (EC 3.2.1.30), que clivam os produtos das endoquitinases e quitobiosidases, gerando monômeros de N-acetilglicosamina (GlcNAc) (**Sahai & Manocha 1993, Dahiya et al., 2006**).

Em *C. albicans* o papel das quitinases estaria relacionado à hidrólise de quitina da parede celular durante a reciclagem da parede celular e eventos morfogenéticos (**Cheng et al., 2000; Munro et al., 2001**). A N-acetil- β -D-glucosaminidase está presente no fungo e atua na hidrólise de quitina de forma coordenada com as quitinases, o que sugere sua associação à patogenicidade e virulência de isolados de *C. albicans* (**Jenkinson & Shepherd, 1987**). Em *P. brasiliensis* a expressão do gene *Pbcts1*, codificante para uma quitinase, foi evidenciada em células leveduriformes, na transição de micélio para levedura e em células leveduriformes obtidas de camundongos infectados com o fungo, o que sugere a participação dessa enzima na infecção por *P. brasiliensis* (**Bonfim et al., 2006**). Os genes para quitina sintase (*Pbrchs1*, *Pbrchs2*, *Pbrchs3*, *Pbrchs4*, *Pbrchs5* e *Pbrchs6*) foram identificados no transcriptoma de *P. brasiliensis* na forma miceliana (**Andrade et al., 2005**). Embora os níveis de quitina sejam mais altos em levedura que em micélio, os altos níveis desses transcritos na fase miceliana sugerem a participação desses genes na morfogênese do fungo. (**Andrade et al., 2005**). Alguns genes relacionados com a síntese de componentes da parede celular foram induzidos na biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis*, micélio para levedura, quando comparado com os resultados obtidos no transcriptoma do fungo (The *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome database - <https://dna.biomol.unb.br/Pb/>). Dentre esses genes estão a fosfoglicomutase

(*pgm*), a UDP-Glicose pirofosforilase (*ugp1*), a α -1,3 glucana sintase (*ags1*) e α -glucosidase 1 (GLCase I) (**Bastos *et al.*, 2007**). A presença desses transcritos na fase leveduriforme pode estar relacionada a uma maior síntese de α -1,3 glucana necessária para o a formação da parede celular da célula leveduriforme e início da fase parasitária. (**San-Blas, 1982; Bastos *et al.*, 2007**).

I.2.2 - CARACTERÍSTICAS DA ENZIMA N-ACETIL- β -D-GLICOSAMINIDASE

A N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) de *P. brasiliensis* é classificada como uma glicosil hidrolase, pertencente à família 20 (E.C.3.2.1). Nesta família encontram-se NAGs de bactérias, fungos e humanos (**Duo-Chuan, 2006**). A NAG está envolvida na degradação da quitina e tem sido purificada em fungos (**Molloy et al., 1994; Diez et al., 2005**), bactérias (**Zhu et al., 1992**) e animais superiores (**Muldoon, et al., 1994; Syntin et al., 1996; Triggs-Raine et al., 1991**).

A NAG está envolvida na formação e modelação de septos de hifas, formação do tubo germinativo de leveduras, na formação de corpos de frutificação (brotamentos) de basidiomicetos (**Ueda et al., 1992; Pera et al., 1997**) na indução do sistema imune humano (**Shen et al., 1995; Jenkinson & Shepherd, 1987**), e no dimorfismo em fungos (**Ghormade et al., 2000**). Genes codificantes para NAGs tem sido clonados para alguns fungos, como *Trichoderma harzianum*, *C. albicans*, e *Aspergillus nidulans* (**Peterbauer et al., 1996; Cannon et al., 1994; Kim et al., 2002**). A clonagem molecular e o seqüenciamento das NAGs revelaram que as NAGs de fungos possuem estrutura composta de peptídeo sinal, domínio tipo zincina, domínio catalítico e segmento C-terminal (**Plihal et al., 2004**).

Algumas NAGs de fungos tem sido caracterizadas. Dentre estas características tem sido relatados a massa molecular o pI, pH ótimo, a temperatura ótima, a termo-estabilidade, inibidores enzimáticos e atividade antifúngica. A massa molecular das NAGs tem sido relatada na faixa de 27 a 190 kDa com um pI entre 3 e 8. O pH ótimo das NAGs varia entre 4 e 7 e a temperatura entre 20 e 40°C (**Harman et al 1993, Ulhoa & Peberdy, 1992; De La Cruz et al., 1992; Taylor et al., 2002; Li et al., 2004; Duo-Chuan, 2006**).

Usualmente as endoquitinases fúngicas e as quitobiosidases são polipeptídios simples; entretanto as NAGs podem ter estruturas mais complexas, como as NAGs de *T. harzianum*, *Stachybotrys elegans* e *Beauveria bassiana* (Ulhoa & Peberdy, 1991; Taylor *et al.*, 2002; Bidochka *et al.*, 1993) que são diméricas ou como as duas NAGs produzidas por *C. albicans* que possuem três subunidades (Molloy *et al.*, 1994). Segundo Soares, (1999) em seu trabalho de purificação e caracterização da NAG em *P. brasiliensis*, a cromatografia em coluna de troca iônica permitiu a separação de duas frações contendo atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase. A determinação da massa molecular da proteína nativa, através cromatografia de filtração em gel, forneceu valores de 203 e 104 kDa para as N-acetil- β -D-glicosaminidases, denominadas NAG I e II, respectivamente. Fracionamentos em condições desnaturantes sugerem que NAG I possua quatro subunidades protéicas, com massas moleculares similares ou idênticas, constituindo a enzima ativa.

II - JUSTIFICATIVA

A parede celular de microorganismos constitui a estrutura de primeiro contato com o hospedeiro e tem papel na manutenção da forma celular de fungos. Desvendar os eventos de síntese e degradação da parede e de seus constituintes torna-se de grande interesse na compreensão dos processos relacionados com a morfogênese de fungos em geral. A interconversão das formas micelianas em leveduriformes faz parte do ciclo biológico de *P. brasiliensis* e constitui uma etapa fundamental para o estabelecimento da infecção. No decorrer dessa transição *P. brasiliensis* sofre transformações que requerem a ruptura e posterior organização de sua parede celular, necessitando, portanto, da atuação de enzimas de parede tais como quitinases, glucanasases e N-acetil- β -D-glicosaminidases (NAG). Em função do exposto e considerando-se os estudos prévios do Laboratório de Biologia Molecular na purificação, caracterização e perfil antigênico de N-acetil- β -D-glicosaminidases propusemos no presente trabalho a caracterização da seqüência codificante, a expressão heteróloga e caracterização da enzima em *P. brasiliensis*.

Vale ressaltar que o interesse na purificação e caracterização de enzimas do sistema quitinolítico tem aumentado à medida que se torna evidente sua atuação e importância na degradação de uma variedade de outras moléculas que contém resíduos de N-acetilglicosamina na extremidade terminal. Atualmente existem mais de 60 genes descritos para N-acetil- β -D-glicosaminidases, em diversos microorganismos, incluindo bactérias, fungos, insetos, plantas e animais.

III - OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho são:

- Caracterização da seqüência codificante da NAG de *P. brasiliensis* (*Pbnag*);
- Promover a expressão heteróloga e a purificação da NAG recombinante de *P. brasiliensis*;
- Produzir anticorpo policlonal contra a molécula recombinante;
- Promover a citolocalização da NAG em células leveduriformes de *P. brasiliensis*;
- Promover a caracterização enzimática da molécula recombinante;

As estratégias utilizadas foram:

- Análises computacionais;
- Clonagem do cDNA *Pbnag* em pGEX-4T-3 e expressão em *Escherichia coli*;
- Purificação de *PbNAG* em coluna de afinidade;
- Imunização de coelhos com *PbNAG*;
- Imunocitocalização através de microscopia eletrônica da *PbNAG* em células leveduriformes de *P. brasiliensis*;
- Ensaio enzimáticos.

IV – RESULTADOS

Os resultados serão apresentados no artigo e no manuscrito a seguir.

V - ARTIGO:

Molecular Cloning and characterization of a cDNA encoding the N-acetyl- β -D-glucosaminidase homologue of *Paracoccidioides brasiliensis*.

VI – MANUSCRITO

Characterization of the N-acetyl- β -D-glucosaminidase from *Paracoccidioides brasiliensis* and its expression in *Escherichia coli*.

Characterization of the N-acetyl- β -D-glucosaminidase from *Paracoccidioides brasiliensis* and its expression in *Escherichia coli*.

Mônica de Oliveira Santos^{1,2}, Mônica Santiago Barbosa¹, Sônia Nair Baó³, Maria Sueli Soares Felipe³, Luciano dos Santos Feitosa⁴, Cirano José Ulhôa⁵ & Célia Maria de Almeida Soares^{1*}.

¹Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, Goiás, Brazil. ² Faculdade de Medicina, Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, D. F. ³ Departamento de Biologia Celular, Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, D. F. ⁴ Universidade Federal de São Paulo, São Paulo. ⁵ Laboratório de Enzimologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, N-acetyl- β -D-glucosaminidase; fungal cell wall.

***Corresponding author:** Célia Maria de Almeida Soares, Laboratório de Biologia Molecular, ICB II, Campus II-Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia-Goiás, Brazil. Phone/fax: 55-62-3521-1110. e-mail: celia@icb.ufg.br

Abstract

In *Paracoccidioides brasiliensis* chitin is found in higher amounts in the yeast than in mycelium and N-acetyl- β -D-glucosaminidase should be involved in determining such differences. The N-acetyl- β -D-glucosaminidase recombinant protein was produced and polyclonal antibody was obtained allowing the protein localization at the fungal cell wall. The recombinant protein was evaluated regarding to its kinetics properties. The K_m and V_{max} values for ρ -nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosamine (ρ NP-GlcNAc) were 0.112 mM and 0.0017 mM min⁻¹, respectively. The optimum temperature was 37 °C and the maximum activity was obtained at pH 4.4. The enzyme was inhibited by glucosamine and N-acetyl- β -D-glucosamine.

Introduction

Paracoccidioides brasiliensis is a dimorphic human pathogenic fungus that causes paracoccidioidomycosis (PCM), the most prevalent mycosis in Latin America. The fungus grows as a yeast form in cultures at 36°C and in host tissues; at lower temperatures the fungus grows as a mold. Temperature-dependent cellular differentiation to the parasitic yeast phase takes place in the lungs. PCM presents a broad spectrum of clinical and pathological manifestations ranging from asymptomatic pulmonary infection to severely disseminated disease (Franco, 1987).

Studies of the yeast and the mycelial cell walls of *P. brasiliensis* had been performed. The molecular architecture and the functional components of the cell wall differ between the yeast and mycelial forms. The presence of β -1,3-glucan in the yeasts, α -1,3 and 1,6-glucan in mycelium, and chitin in both forms was confirmed. During the transition from mycelium to yeast there is an increase in the amount of chitin and a shift in the anomeric structure of the predominant polymer β -glucan to α -glucan (Kanetsuna *et al.*, 1969; San-Blas *et al.*, 1994).

Chitin, a β -1, 4-linked polymer of N-acetylglucosamine (GlcNAc), has its degradation performed by the chitinolytic system classified into two major categories, endochitinases (EC 3.2.1.14), and the exochitinases, chitobiosidases (EC 3.2.1.29), and N-acetyl- β -D-glucosaminidases (NAG) (EC 3.2.1.30) (Sahai & Manocha 1993). Since, chitin is found in higher amounts in the yeast phase than in the mycelial phase NAG may be involved in determining such differences, thus playing role in the fungal differentiation of *P. brasiliensis*. The potential importance of NAG in the *P. brasiliensis* differentiation and the paucity of studies regarding the role of the enzymes of the chitinolytic system in the cell biology of this pathogenic fungus led us to address studies on the cellular localization and

on expression of the NAG in *P. brasiliensis*, as well as to analyze the kinetic parameters of the recombinant protein produced in a bacterial system.

Materials and methods

Organism and culture conditions

P. brasiliensis isolate *Pb01* (ATCC-MYA-826) has been previously investigated by our laboratory and was cultivated in semi-solid Fava Neto's medium [1% (w/v) peptone; 0.5% (w/v) yeast extract; 0.3% (w/v) proteose peptone; 0.5% (w/v) beef extract; 0.5% (w/v) NaCl; 1% (w/v) agar, pH 7.2] at 22°C in the mycelia form and at 36°C to the yeast phase.

Expression and purification of the recombinant NAG of *P. brasiliensis*

The cloned cDNA containing the complete coding region of N-acetyl- β -D-glucosaminidase (*PbNAG*) (Santos *et al.*, 2004) was amplified by PCR using oligonucleotide primers sense (5' - **GGAAAGGATCC**ATGCTGCTCTCTG - 3') and antisense (5' - **CGCCGCGGCCG**CTCACAGCAC - 3') added with *Bam*HI and *Not*I restriction sites (in bold letters). The amplification parameters were as follows: an initial denaturation step at 94°C for 2 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 51°C for 2 min and extension at 72°C for 2 min. A final elongation step was performed at 72°C for 7 min. The resulting 1.7 Kbp product was digested with the restriction enzymes *Bam*HI and *Not*I and inserted into pGEX-4T3 (GE, Healthcare®). The recombinant plasmid (pGEX-4T-3-NAG) was used to transform the *Escherichia coli* C41 (DE3) competent cells by using the heat shock method

(Sambrook & Russel, 2001). Ampicillin-resistant transformants were cultured and plasmid DNA was analyzed by PCR and subsequently sequenced on both strands.

To obtain the recombinant protein (*PbNAG*), the *E. coli* cells containing the plasmid pGEX-4T-3-NAG was grown in LB medium supplemented with 1% (w/v) glucose and 100 mg/mL ampicillin to an absorbance of 0.6 at 600 nm. The culture was then added of 0.5 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, Mo., USA) and incubated for 2 h at 28°C with constant shaking. Cells were harvested by centrifugation at 3000 g for 10 min at 4°C and the pellet was resuspended in a 1/50 volume of phosphate-buffered saline (PBS 1X, 150 mM NaCl, 8.4 mM, Na₂HPO₄, 1.9 mM NaH₂PO₄) and incubated with lysozyme (100 μ g/ml) at 4°C for 1 h. The IPTG-induced cells were sonicated for 10 min at 4°C in PBS-buffer supplemented with 1% *N*-lauroylsarcosine. Subsequently, it was added 1.2% of Triton X-100 and the cell lysate was mixed with glass beads, filtered through 0.45- μ m-pore-size nitrate filters and dialyzed against a 100-fold volume of 20 mM Tris-HCl pH 8.0, at 4°C overnight. The lysate was centrifuged at 10000 g for 15 min at 4°C and aliquots were frozen at -20°C. Purification of the recombinant protein by affinity chromatography on glutathione-Sepharose 4B was performed according to the instructions of the manufacturer (GE Healthcare[®]). Briefly, the bacterial lysate (20 ml of bacterial culture) was incubated with 0.4 mL of a 50% (v/v) glutathione-Sepharose 4B in PBS at 4°C for 1 h. The column was washed with 20 ml of PBS containing 0.5% (v/v) Triton X-100, and the GST fusion protein was eluted from the resin by incubation with elution buffer containing Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 and 20 mM glutathione, for 30 min at 4°C. The fusion protein was cleaved by adding thrombin (GE Healthcare[®]) in PBS at 18°C for 6 h.

Polyclonal antibody production

The purified *Pb*NAG was used to generate rabbit polyclonal antibody. Immunization was carried out by subcutaneous injection of the purified protein (300µg) into rabbit with Freud's adjuvant, three times at 2 weeks intervals. The obtained serum, containing specific anti-NAG polyclonal antibody, was sampled and stored at -20°C. Pre immune rabbit serum was collected before the immunization and stored at -20°C for analysis.

Preparation of *P. brasiliensis* cells extracts

Yeast and mycelium protein crude extracts were obtained by disruption of frozen cells in the presence of protease inhibitors: 50µg/ml N-α-p-tosyl-L-lysine chloromethylketone (TLCK); 1 mM 4-chloromercuribenzoic acid (PCMB); 20 mM leupeptin; 20 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PSMF) and 5 mM iodoacetamide in homogenization buffer (20mM Tris-HCl, pH 8.8; 2mM CaCl₂). The mixture was centrifuged at 12000 g at 4°C for 10 min, and the supernatant was used for further analysis.

Polyacrylamide gel electrophoresis and Western-blot analysis

Polyacrylamide gel electrophoresis was performed (Laemmli, 1970) with 12% resolving gels. The proteins were visualized with Coomassie brilliant blue R-250 or were electrophoretically transferred to a nylon membrane and checked by Ponceau S to determine equal loading. The NAG was detected with the polyclonal antibody raised to the recombinant protein (1:1000 diluted). After reaction with alkaline phosphatase coupled-anti rabbit IgG (1:3000 diluted), the reaction was developed with 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitrobluetetrazolium (BCIP/NBT).

Immunoelectromicroscopy of the *Pb*NAG

For the ultrastructural and immunoelectromicroscopy studies it were employed the protocols previously described (Barbosa *et al.*, 2006). After fixation of the yeast cells it were obtained ultrathin sections that were stained with 3% (w/v) uranyl acetate, and lead citrate. For ultrastructural immunoelectromicroscopy studies, the ultrathin sections were incubated for 1 h with the polyclonal antibody raised against the recombinant NAG (diluted 1:100) and for 1 h at room temperature with the labeled secondary antibody rabbit IgG, Au conjugated (10 nm average particle size; 1:20 dilution). The grids were stained as described above and observed with a Jeol 1011 transmission electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan). Controls were incubated with mouse preimmune serum at 1:100, followed by incubation with the labeled secondary antibody.

***Pb*NAG enzymatic assay**

Enzyme activity was measured by using the chromogenic substrate *p*-nitrophenyl- β -N-acetylglucosamine (*p*NP-GlcNAc, Sigma-Aldrich[®]) as described by Ulhoa & Peberdy (1993). Standard reaction mixtures (total volume 500 μ l) contained 50 μ l of the sample of *Pb*NAG (containing 30 μ g of purified protein) with 350 μ l of 50 mM citrate phosphate buffer (pH 4.4), and 100 μ l of 5 mM *p*NP-GlcNAc substrate. The mixture was incubated at 37°C for 15 min, and the reaction was stopped by the addition of 1 ml of 250 mM sodium carbonate solution. The absorbance of the mixture was determined at 405 nm. One unit of the enzyme was defined as the amount of

enzyme that released 1 μ mol of ρ -nitrophenol in 1 min under the conditions described above.

Effect of temperature and pH on activity and stability of *Pb*NAG and determination of the Michaelis-Menten constant (K_m)

For evaluation of the effect of temperature on the enzymatic activity reaction mixtures were incubated for 30 min, 1 h, 2 h, 3 h and 4 h at different temperatures covering the range 25-60°C in 100 mM phosphate citrate buffer pH 4.4 and the enzymatic activity was measured at each tested temperature. The effect of pH on the enzyme activity was tested at 37°C in the pH range 3 – 7. For evaluation of the temperature on stability of the *Pb*NAG, mixtures of the enzyme and 100 mM phosphate citrate buffer, pH 4.4, were incubated for 30 min, 1 h, 2 h, 3 h and 4 h at 37°C. After this pre incubation, the substrate was added and the activity was measured at 37°C for 3 hours. The Michaelis-Menten constant (K_m) analysis was determined by non-linear-regression analysis of the data obtained by measuring the rate of ρ NP-GlcNAc hydrolysis at increasing concentrations of the substrate (from 0.1 mM to 1 mM).

Enzyme specificity to different substrates

We investigated the substrate specificity of the enzyme by using the following chromogenic substrates at concentration of 5 mM: ρ -nitrophenyl- β -D-N,N'-diacetylchitobioside (ρ NP-GlcNAc)₂, ρ -nitrophenyl- β -D-N,N',N''-triacetylchitotriose (ρ NP-GlcNAc)₃, ρ -nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (ρ NP-Gluc) and ρ -nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ρ NP-Gal).

Results and Discussion

Production of the recombinant *Pb*NAG and reactivity to the polyclonal antibody

The cDNA encoding the *P. brasiliensis* NAG was cloned resulting in high-level expression of the recombinant protein. After induction with IPTG, a 94 kDa recombinant protein was detected in bacterial lysates (Fig. 1 A, lane 3). The fusion protein was purified (Fig. 1 A, lane 4). After the last step of purification, the specific activity of the extract, expressed as units of enzyme per mg of protein, increased from 122.3 to 630.9, a 5.16 fold increase, resulting in a yield of 16.9% (Table 1). The extracts of *E.coli* cells, of the bacterial cells harboring the control vector pGEX-4T-3, of the IPTG induced cells, and the purified *Pb*NAG were subjected to SDS-PAGE analysis, blotted onto nitrocellulose membrane and reacted to the polyclonal antibody (Fig. 1A , lanes 5 to 8). A single band of 94 kDa reacted in the *E. coli* cells extract containing the fusion-protein, as well as, with the purified *Pb*NAG (lanes 7 and 8, respectively). The pre-immune sera do not present reaction to the analyzed protein extracts (Fig. 1A, lanes 9 to 12).

Detection of the NAG in *P. brasiliensis*

The specific polyclonal antibody was reactive with *P. brasiliensis* yeast and mycelium cells (Fig. 1 B, lanes 3 and 4, respectively), revealing a protein species of 64 kDa, much more abundant in the yeast parasitic phase. No cross-reactivity to the rabbit pre-immune serum was evidenced with the same samples (lanes 5 and 6). The preferential expression of the *Pb*NAG in yeast cells could indicate special functions in this fungal parasitic phase. In this sense, it has been described the modification of host cell surfaces by

removing terminal GlcNAc residues from proteins, exposing carbohydrates receptors to which fungal cells could bind, thus giving to the fungus advantage in cells colonization, as suggested for the *C. albicans* NAG homologue (Cannon *et al.*, 1994).

Immunocytochemistry experiments using ultrathin sections of LRGold embedded yeast cells of *P. brasiliensis* defined the cellular localization of the *Pb*NAG in *P. brasiliensis*. The ultrastructure of *P. brasiliensis* yeast form was performed by electron microscopy of conventionally embedded cells (Fig. 2A). Gold particles were detected predominantly and abundantly in the cell wall, indicating the preferential localization of the *P. brasiliensis* NAG (Fig. 2B and C). Control experiments were obtained by incubation of the yeast cells with the rabbit pre-immune serum, demonstrating no label (Fig. 2D). The demonstrated cellular localization of the protein is consistent with the presumed localization based on computational analysis of the predicted protein (Santos *et al.*, 2004). The deduced protein presents a putative signal peptide and a cleavage site, indicating the protein route to the fungal cell wall as described to the *C. albicans* NAG (Molloy *et al.*, 1995). The presence of a small number of gold particles in the cytoplasm could be accounted for the protein trafficking to the cell surface. *P. brasiliensis* localization mostly in the cell wall is suggestive of a chitin turnover function in fungal cells.

Recombinant enzyme characterization

The recombinant protein showed Michaelis-Menten type kinetics with ρ NP-GlcNAc as substrate. The K_m and V_{max} were 0.112 mM and 0.0017 mM respectively (Fig. 3A). The optimum temperature and pH were 37°C and 4.4 (Fig. 3B and C, respectively). After pre-incubation at 37°C for several periods of time at pH 4.4, the enzyme retained 69% of its original activity after 4 h incubation (data not shown). The values K_m for *Pb*NAG was lower than the values presented by the enzyme of *Aspergillus niger* (0.2 mM) and *Trichoderma harzianum* (0.235 mM) (Pera *et al.*, 1997; De Marco *et al.*, 2004), indicating that the *Pb*NAG has a high affinity for the substrate.

The optimal temperature of *Pb*NAG is 37°C and is lower than those observed for NAGs produced by other organisms such as *Streptomyces thermoviolaceus* (60°C) (Tsujiibo *et al.*, 1998) and *A. niger* (65°C) (Pera *et al.*, 1997). The optimal pH (4.4) of the *Pb*NAG is comparable with the pH for NAGs produced by *S. thermoviolaceus* (5.0) (Tsujiibo *et al.*, 1998), *Streptomyces hygroscopicus* (4.5) (Irhuma *et al.*, 1991), *Trichoderma harzianum* (4.0) (De Marco *et al.*, 2004).

The *Pb*NAG shows high affinity to ρ NP-GlcNAc and lower specific activity for the hydrolysis of $(\rho$ NP-GlcNAc)₂, $(\rho$ NP-GlcNAc)₃, ρ NP-Galac and ρ NP-Gluc (Table 2), suggesting that this enzyme is a N-acetyl- β -D-glucosaminidase as defined by Sahai & Manocha (1993). This data suggest the enzyme participation in the processing of GlcNAc-containing glycoconjugates during fungal metabolism as described for NAG from *Bipolaris sorokiniana* (Geimba *et al.*, 1998). The *Pb*NAG was also capable of hydrolyzing the substrate $(\rho$ NP-GlcNAc)₂, suggesting a possible function in chitin metabolism.

The *Pb*NAG activity was tested in presence of carbohydrates, as shown in Table 3. The results indicated that the NAG of *P. brasiliensis* was poorly affected by glucose. The presence of glucosamine and N-acetylglucosamine inhibited the enzyme activity due to the competition between the carbohydrates and the substrate pNP-GlcNAc, as described by NAG produced by *T. harzianum* (Ulhoa & Peberdy, 1991).

In synthesis, the NAG, which could be critical for the cell wall metabolism during the dimorphic fungal transition, as well as during fungal growth putatively, by promoting hydrolysis of the chitin, localizes predominantly and abundantly in the fungal cell wall of the yeast parasitic phase. This data suggest that this fungal cell may be ready to perform the molecular changes in the cell wall content prior to the trigger of cellular differentiation. The enzyme could also participate in the modelation of cell wall in yeast cells providing precursors for the synthesis of chitin.

Acknowledgments

The work at Universidade Federal de Goiás was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado de Goiás (SECTEC-PRONEX-CNPq). Mônica O Santos is a doutoral fellow of CNPq and Mônica Santiago Barbosa has a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

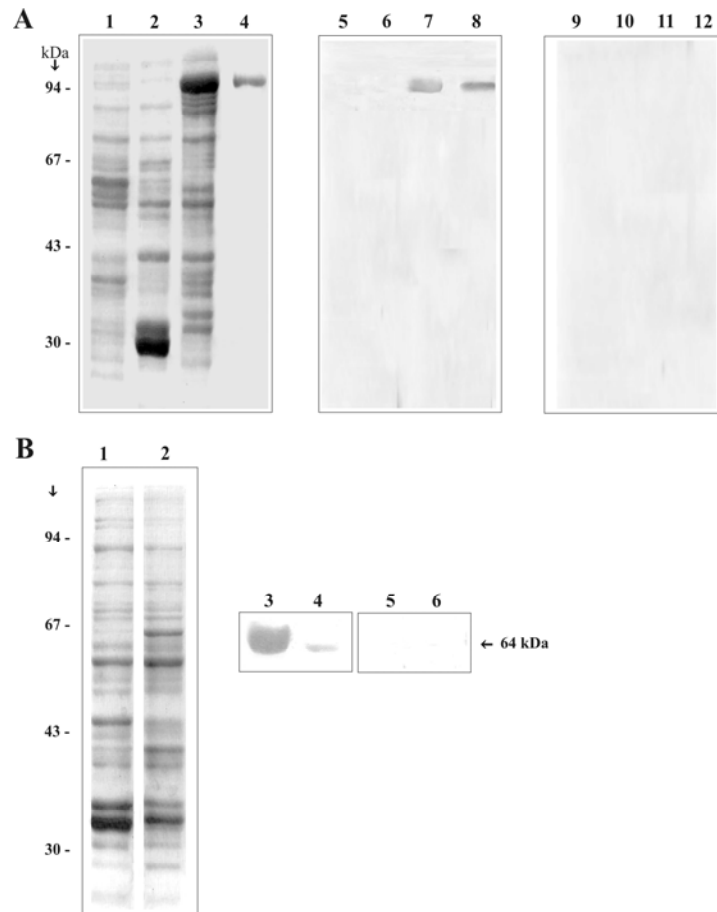


Fig. 1. Expression and purification of recombinant NAG of *P. brasiliensis* and analysis of the protein expression. (A) Production of the recombinant protein and its reactivity to the polyclonal antibody. Lane 1, *E. coli* cells were grown to an A_{600} of 0.6 for 2 h; lane 2, *E. coli* cells transformed with pGEX-4T-3; lane 3, *E. coli* cells transformed with pGEX-4T-3-NAG after incubation with 0.5 mM IPTG for 2 h; lane 4, *PbnAG* fusion protein after purification. The same samples as in A were detected by using the rabbit polyclonal anti *PbnAG* antibody (lanes 5 to 8) or rabbit pre-immune serum (lanes 9 to 12). Molecular markers are indicated. B- Detection of the NAG in *P. brasiliensis*. SDS-PAGE of total proteins of *P. brasiliensis*, lane 1, yeast cells (30 μ g); lane 2, mycelium (30 μ g). The same samples were fractionated by electrophoresis, blotted to nitrocellulose membranes and reacted with the rabbit polyclonal anti *PbnAG* antibody (lanes 3 and 4) or with the pre-immune serum (lanes 5 and 6). Molecular markers are indicated.

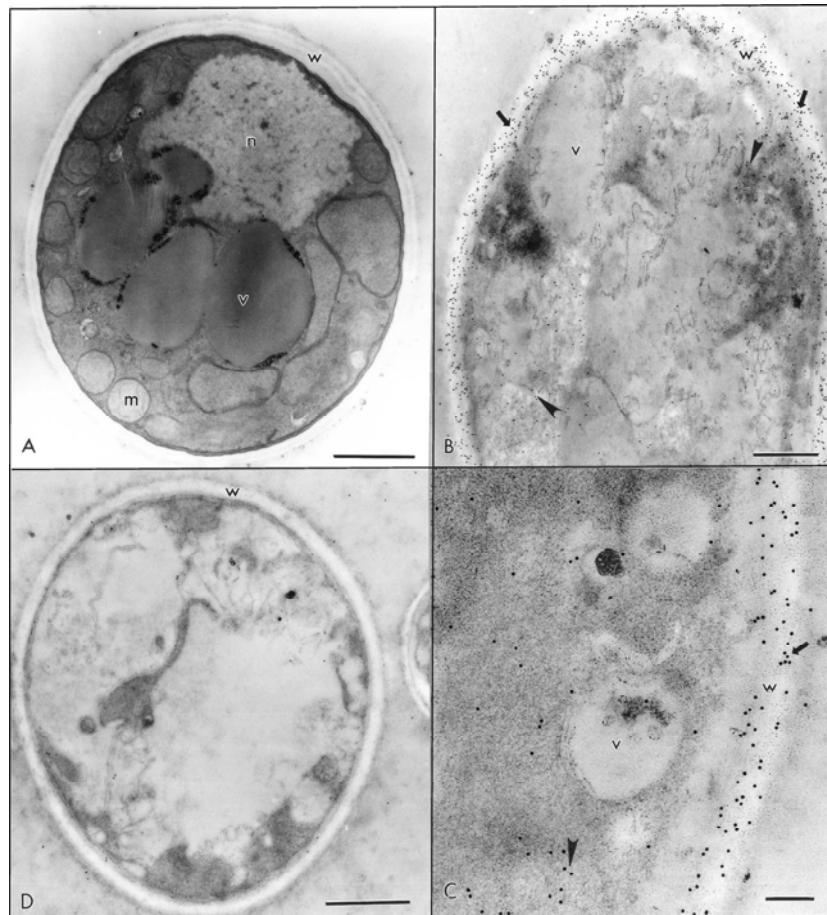


Fig. 2. Ultra structural localization of NAG in *P. brasiliensis* yeast cells. A- Transmission electron microscopy of *P. brasiliensis* yeast cells; nucleus (n), vacuoles (v) mitochondria (m) and cell wall (w). B and C- Protein immunodetection. Gold particles (arrows) are observed predominantly in the cell wall, with a small amount in the cytoplasm (arrowheads). D-The negative control exposed to the mouse pre-immune serum. Bars, 1 μm (A and D), 0.5 μm (B) and 0.2 μm (C).

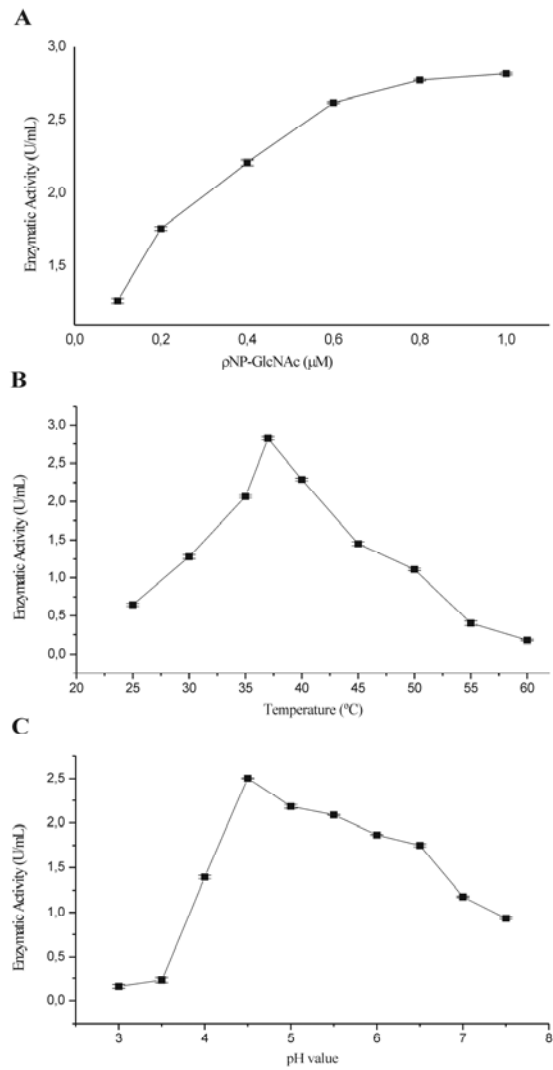


Fig. 3. Biochemical properties and kinetic parameters of NAG from *P. brasiliensis*. A- The initial velocity values were determined by using ρNP-GlcNAc as the substrate. B – Effect of the temperature and C - Effect of the pH on the activity. All data are means \pm SD of three independent duplicate determinations.

Table 1. Purification and activity of the recombinant NAG of *P. brasiliensis*.

Purification Step	Total Protein (mg)	Total Activity ^a (Units)	Specific Activity ^b (Units/mg)	Purification ^c fold	Yield ^d (%)
Culture supernatant	64.2	7856	122.3	1	100
Dialyzed concentrate after solubilization	8.3	1750	210.8	1.72	22.3
Glutathione Sepharose-4B	2.1	1325	630.9	5.16	16.9

^a Amount of protein measured in 20 mL of produced extract.

^b Total activity in 20 mL of produced extract.

^c Calculated as the ratio between the specific activity and crude extract.

^d % of remaining activity in each step.

Table 2. Relative substrate specificity of the recombinant NAG of *P. brasiliensis*.

Substrate	Specific Activity (%)*
ρ -nitrophenyl- β -D-N-acetylglucosamine (ρ NP-GlcNAc)	100
ρ -nitrophenyl- β -D-N,N'-diacetylchitobioside (ρ NP-GlcNAc) ₂	22.2
ρ -nitrophenyl- β -D-N,N',N''-triacetylchitotriose (ρ NP-GlcNAc) ₃	5.9
ρ -nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ρ NP-Galac)	9.8
ρ -nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (ρ NP-Gluc)	5

*All data are means \pm SD of three independent duplicate determinations.

Table 3. Effect of carbohydrates on the activity of the recombinant NAG of *P. brasiliensis*.

Carbohydrate	Relative activity (%)*		
	5 mM	10 mM	20 mM
Control (without addition of carbohydrates)	100	100	100
Glucose	NT	98,6	98
Glucosamine	49.4	47	NT
N-acetylglucosamine	48.6	46.1	NT

* The activity of NAG with no addition of carbohydrates was arbitrarily set at 100%. All data are means \pm SD of three independent duplicate determinations.

NT - Non tested.

References

- Barbosa MS, Bao SN, Andreotti PF, Faria FP, Felipe MSS, Feitosa LS, Mendes-Giannini MJS & Soares CMA (2006) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun* **74**: 382–389.
- Cannon RD, Niimi K, Jenkinson HF & Shepherd MG (1994) Molecular cloning and expression of the *Candida albicans* β -N-acetylglucosaminidase (*HEX1*) gene. *J Bacteriol* **176**: 2640-2647.
- De Marco JL, Valadares-Inglis MC & Felix CR (2004) Purification and characterization of an N-acetylglucosaminidase produced by a *Trichoderma harzianum* strain which controls *Crinipellis pernicioso*. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**: 70-75.
- Franco M (1987) Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* **25**: 5-18.
- Geimba MP, Riffel A, Brandelli A (1998) Purification and characterization of β -N-acetylhexosaminidase from the phytopathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana*. *J Appl Microbiol* **85**:708–714.
- Irhuma A, Gallagher J, Hackett TJ & McHale AP (1991) Studies on N-acetylglucosaminidase activity produced by *Streptomyces hygroscopicus*. *Biochim Biophys Acta*. **1074**: 1-5.
- Kanetsuna F, Carbonell LM, Moreno RE & Rodriguez J (1969) Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* **97**:1036-1041.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

- Molloy C, Shepherd MG & Sullivan PA (1995) Differential extraction of N-acetylglucosaminidase and trehalase from the cell envelope of *Candida albicans*. *Exp Mycol* **19**: 178-185.
- Pera LM, Infante Majolli MV, Baigori MD (1997) Purification and characterization of a thermostable and highly specific beta-N-acetyl-D-glucosaminidase from *Aspergillus niger* 419. *Biotechnol Appl Biochem* **26**:183-187.
- Sahai AS & Manocha MS (1993) Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiol Rev* **4**: 317-338.
- Sambrook J & Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- San-Blas G & San-Blas F in: Maresca B & Kobayashi GS (Eds). Preparation and analysis of purified cell walls of the mycelial and yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. Telos Press, New York, 1994, pp. 489-498.
- Santos MO, Pereira M, Felipe MSS, Jesuino RSA, Ulhoa CJ, Soares RBA & Soares CMA (2004) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the N-acetyl- β -D-glucosaminidase homologue of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* **42**: 247-253.
- Tsujibo H, Hatano N, Mikami T, Hirasawa A, Miyamoto K & Inamori Y (1998) A novel beta-N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520: Gene cloning, expression, and assignment to family 3 of the glycosyl hydrolases. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2920-2924.
- Ulhoa CJ & Peberdy JF (1993) Effect of carbon sources on chitobiose production by *Trichoderma harzianum*. *Mycol Res* **97**: 45-48.

Ulhoa CJ & Peberdy JF (1991) Purification and characterization of an extracellular chitobiase *Trichoderma harzianum*. *Curr Microbiol* **5**: 285-289.

VII - DISCUSSÃO

Os experimentos iniciaram-se com a análise de seqüências de aminoácidos de para NAGs de outros microrganismos patogênicos. A partir das regiões conservadas foram construídos oligonucleotídeos degenerados que, em reação de amplificação, via PCR, do DNA total de *P. brasiliensis* originaram dois fragmentos, de 666 pb e 540 pb. Análises das seqüências obtidas confirmaram que o fragmento de 540 pb estava contido dentro da seqüência de 666 pb (dado não mostrado). O fragmento de 666 pb, que foi designado *Pbnag*, apresentou homologia com NAGs de diferentes organismos. Além disso, duas regiões conservadas entre as NAGs foram encontradas na seqüência deduzida de aminoácidos de *Pbnag*, mostrando que a estratégia foi adequada para a obtenção do fragmento genômico de interesse.

O fragmento genômico *Pbnag* (nº de acesso GenBank AF395815) foi utilizado como sonda no rastreamento da biblioteca da cDNA, forma leveduriforme de *P. brasiliensis*, isolado *Pb* 01. Foram obtidos 04 clones, os quais foram seqüenciados. Observou-se identidade entre as seqüências de cDNA, o que poderia sugerir a presença de um único tipo de molécula de RNA codificante para NAG em *P. brasiliensis*. A presença de uma única espécie de mRNA, evidenciada em ensaios de “northern blot”, corrobora essa sugestão.

O clone de cDNA apresenta uma seqüência de 2663 nucleotídeos. Foi observada uma região 5' não traduzida com 720 nucleotídeos. O ATG na posição 721, codificando para a possível metionina iniciadora está no contexto de um sítio consenso de iniciação consistindo de uma adenina na posição -3 (**Kozak, 1986**). Uma região 5' não traduzida de 720 pb é um tanto longa, quando comparada à médias observadas, mas existem descrições similares para cDNAs de outros

fungos. Para exemplificar, um cDNA de *Coccidioides immitis*, codificante para um antígeno do microrganismo, apresenta 458 pb na região 3' não traduzida (**Rugger et al., 1996**). O significado biológico desses achados não é completamente conhecido.

Pbnag codifica para uma proteína de 577 aminoácidos, com massa molecular predita de 64,7 kDa. Os primeiros 30 resíduos de aminoácidos, dos quais 25 são hidrofóbicos, apresentam características de um peptídeo sinal (**Izard & Kendall, 1994**). Os aminoácidos hidrofóbicos do provável peptídeo sinal presumivelmente formam uma alfa hélice, como descrito, por exemplo, para *T. harzianum* P1 (**Peterbauer et al., 1996; Draborg et al., 1995**). Ocorre um sítio potencial de clivagem para uma peptidase sinal após o aminoácido 17 (Alanina). A clivagem nesse sítio, geraria uma proteína madura de 560 aminoácidos, massa molecular predita de 62,97 kDa e pI 6,46. Características similares de peptídeo sinal são também encontradas na NAG de *Alteromonas sp*, linhagem O-7 (**Tsujibo et al., 1995**). A presença de peptídeo sinal sugere o provável endereçamento da proteína para a parede celular de *P. brasiliensis*. Corroborando essa hipótese, uma NAG caracterizada em *C. albicans* é secretada e depositada em diferentes regiões do envelope celular em leveduras e micélio (**Pugh & Cawson, 1977; Sullivan et al., 1984; Molloy et al., 1994**).

Segundo **Marshall, (1972)** as seqüências N-X S/T – X (desde que X não seja prolina) são alvos para glicosilação. A proteína *PbNAG* apresenta seis sítios potenciais de N-glicosilação presentes nas posições 29, 78, 117, 283, 342, 447. Na literatura são descritas NAGs altamente glicosiladas. Em *T. harzianum*, uma exoquitinase apresenta cinco sítios de N-glicosilação (**Draborg et al., 1995**). Em *Caenorhabditis elegans* foram descritos quatro potenciais sítios de N-glicosilação (**Miller & Langston,**

1996) e em *C. albicans* (Cannon *et al.*, 1994) no gene HexA são encontrados sete potenciais sítios de glicosilação.

Comparações da seqüência de aminoácidos da *PbNAG* mostraram considerável homologia com outras N-acetil- β -D-glicosaminidases (E.C 3.2.1.30) e hexosaminidases (E.C 3.2.1.52), (Draborg *et al.*, 1995; Cannon *et al.*, 1994). O maior valor foi 44 % de identidade encontrada com NAG de *T. harzianum* (Peterbauer *et al.*, 1996). O tamanho das proteínas (NAGs) homólogas varia de 412 a 650 aminoácidos, com algumas exceções como *Vibrio harveyi* (883 aa) (Graham *et al.*, 1988) e *Serratia marcescens* (885 aa) (Tews *et al.*, 1996), que são consideradas longas. A seqüência deduzida de aminoácidos de *Pbnag*, com 577 resíduos, está em concordância com as descrições acima.

PbNAG apresentou também homologia com um grupo de enzimas classificado como glicosil hidrolases, família 20. As glicosil hidrolases, que também abrangem as NAGs, compreendem um grupo de enzimas que promove a hidrólise em moléculas formadas por resíduos de N-acetilglicosamina e/ou N-acetilgalactosamina. A classificação dessas enzimas em famílias baseia-se na similaridade das seqüências de aminoácidos, na especificidade ao substrato e na estrutura da proteína (Henrissat & Bairoch, 1996). Essas enzimas possuem um domínio catalítico característico para classificação e atualmente existem 86 famílias de glicosil hidrolases. O alinhamento da seqüência de *PbNAG* utilizando-se o programa CLUSTAL V (Higgins & Sharp, 1988), permitiu a identificação do provável domínio catalítico nas posições 154 a 351 das glicosil hidrolases como descrito por Henrissat & Bairoch (1993). O motivo SGPG, característico de ligação à N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina localiza-se dentro do provável domínio catalítico de *PbNAG*.

A deposição e alteração de constituintes da parede celular durante o crescimento e morfogênese de *P. brasiliensis* representa um alvo potencial para a exploração de sítios alternativos no desenvolvimento de novos antifúngicos. Um aspecto crucial no desenvolvimento de drogas contra patógenos eucariotos é a identificação de enzimas ou processos que são essenciais ao patógeno, mas são ausentes ou suficientemente diferentes no hospedeiro humano. Nesse contexto, a síntese e remodelação da parede celular são um alvo atraente, dado que a síntese contínua de glucanas e quitina são essenciais para a viabilidade dos fungos e esses processos não encontram similaridade nas células do hospedeiro (**Ruiz-Herrera, 1991; Georgopapadakou & Tkacz, 1995**). Nesse contexto, a clonagem do cDNA *Pbnag* possibilitará a produção da proteína recombinante visando também futuros estudos de desenhos de novas drogas antifúngicas.

Após sua caracterização, o *Pbnag* foi clonado em vetor de expressão, expresso em *E. coli* e a proteína recombinante foi purificada em coluna de afinidade. A proteína recombinante NAG foi utilizada para imunização de coelhos e produção de anticorpo anti-NAG. O anticorpo anti-NAG detectou a proteína nativa NAG de *P. brasiliensis*, com massa molecular predita de 64 kDa (**Santos et al., 2004**), em extrato de células micelianas e leveduriformes. A expressão de *PbNAG* foi preferencial na forma leveduriforme de *P. brasiliensis* indicando uma função especial nessa fase de desenvolvimento do fungo.

Os dados obtidos com os experimentos de imunocitocalização demonstraram que *PbNAG* está presente na parede celular de *P. brasiliensis*. Esta localização celular confirma análises computacionais da seqüência codificante para a NAG de *P. brasiliensis* (**Santos et al., 2004**). O cDNA codificante para *PbNAG* apresenta um possível peptídeo sinal e sítio de clivagem, indicando que a proteína segue uma via de endereçamento para parede celular, como descrito para NAG de *C. albicans* (**Molloy et al.,**

1995). A presença de algumas partículas de ouro no citoplasma das células estudadas poderia ser devida ao tráfego da proteína para a superfície celular, onde a enzima deve participar da remodelação da quitina presente na parede celular do fungo.

A afinidade de *PbNAG* pelo substrato específico ρ -nitrofenil- β -D-N-acetilglicosamina (ρ NP-GlcNAc) foi analisada, sendo os valores obtidos de K_m para *PbNAG* menores que os valores apresentados por *Aspergillus niger* (0.2 mM) e *Trichoderma harzianum* (0.235 mM) (Pera *et al.*, 1997; De Marco *et al.*, 2004), indicando que *PbNAG* apresenta alta afinidade pelo substrato ρ -nitrofenil- β -D-N-acetilglicosamina (ρ NP-GlcNAc).

A temperatura ótima de atividade enzimática de *PbNAG* é 37°C, idêntica a temperatura ótima para a proteína NAG nativa de *P. brasiliensis* (Soares, 1999) é menor que temperaturas apresentadas por outros microorganismos como *Streptomyces thermoviolaceus* (60°C) (Tsujibo *et al.*, 1998) e *A. niger* (65°C), (Pera *et al.*, 1997). O pH ótimo (4.4) de *PbNAG* é menor que o pH apresentado pela enzima NAG nativa de *P. brasiliensis* (5.5) (Soares, 1999) e compatível com o pH apresentado por *S. thermoviolaceus* (5.0), (Tsujibo *et al.*, 1998) *Streptomyces hygroscopicus* (4.5), (Irhuma *et al.*, 1991), *T. harzianum* (4.0) (De Marco *et al.*, 2004).

PbNAG apresentou alta afinidade por resíduos de N-acetilglucosamina (GlcNAc), evidenciado pela alta hidrólise de ρ -nitrofenil- β -D-N-acetilglucosamina (ρ NP-GlcNAc). Estes dados sugerem que a enzima tem participação no processamento de resíduos de GlcNAc glicoproteínas durante o metabolismo fúngico como descrito para NAG de *Bipolaris sorokiniana* (Geimba *et al.*, 1998). *PbNAG* foi capaz de hidrolisar o substrato ρ -nitrofenil- β -D-N,N-diacetilquitobioside (ρ NP-GlcNAc)₂, sugerindo um possível papel no metabolismo da quitina presente na parede celular de *P. brasiliensis*.

VIII – BIBLIOGRAFIA

- Adam, R., Kaitmann B., Rudin, W., Friedrich, T., Marti, T. & Lucius, R. (1996). Identification of chitinase as the immunodominant filarial antigen recognized by sera of vaccinated rodents. *J. Biol. Chem.* **271**: 1441-1447.
- Adams, D.J. (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiol.* **150**: 2029–2035. Boot RG, Bussink AP, Verhoek M, De Boer PAJ,
- Albornoz, M.B. (1971). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia.* **9**: 248-253.
- Almeida, F. (1930). Estudos comparativos do granuloma coccidio nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasita brasileiro. *An. Fac. Med. São Paulo* **5**: 125-141.
- Andrade, R.V., Silva, S.P., Torres, F.A.G., Poças-Fonseca, M.J., Silva-Pereira, I., Maranhão, A.Q., Campos, E.G., Moraes, L.M.P., Jesuino, R.S.A., Pereira, M., Soares, C.M.A., Walter, M.E.M.T., Carvalho, M.J.A., Almeida, N.F., Brígido, M.M & Felipe, M.S.S. (2005). Overview and perspectives on the transcriptome of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev Iberoam Micol.* **22**: 203-212.
- Aristizabal, B.H., Clemons, K.V., Stevens, D.A., Restrepo, A. (1998). Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition females. *Infec Immun* **66**: 5587-5591.
- Bagagli, E., Bosco, S.M.G., Theodoro, R.C. & Franco, M. (2006). Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect. Genet. Evol.* **24**: 125-129
- Bagagli, E., Franco, M., Bosco, S.M.G., Hebelers-Barbosa, F., Trinca, L. & 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., Camargo, Z.P., Gomes, G.M., Franco, M. & Montenegro, M.R. (1998). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**: 505-12.

- Barbosa, M.S., Bao, S.N., Andreotti, P.F., Faria, F.P., Felipe, M.S.S. Feitosa, L.S., Mendes-Giannini, M.J.S. & Soares, C.M.A. (2006). Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* Is a Cell Surface Protein Involved in Fungal Adhesion to Extracellular Matrix Proteins and Interaction with Cells. *Infec. and Imm.* 382–389.
- Bartinick-Garcia, S.; Martinick, D.D. & Gierz, G. (1995). Determinants of fungal cell wall morphology : the vesicle supply center. *Can. J. Bot.* **73**: 372-378.
- Bastos, K. P, Bailao, A. M, Borges, C.L. , Faria, F. P., Felipe, M. S., Silva, M. G., Martins, W. S., Fiuza, R.B., Pereira, M., Soares, C. M. (2007). The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol.* **10**: 7-29.
- Bastos, K.P., Bailao, A.M., Borges, C.L., Faria, F.P., Felipe, M.S.S., Silva, M.G., Martins, W.S., Fiuza, R.B., Pereira, M. & Soares, C.M.A. (2007). The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process.
- Batista, W.L., Matsuo, A. L., Ganiko, L., Barros, T. F, Veiga, T. R, Freymuller, E., Puccia, R. (2006). The *PbMDJ1* gene belongs to a conserved MDJ1/LON locus in thermodimorphic pathogenic fungi and encodes a heat shock protein that localizes to both the mitochondria and cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryot Cell.* **5**: 379-90.
- Batista, W.L., Matsuo, A.L., Ganiko, L., Barros, T.F., Veiga, T.R. Freymüller, E. & Puccia, R. (2006). The *PbMDJ1* Gene Belongs to a Conserved MDJ1/LON Locus in Thermodimorphic Pathogenic Fungi and Encodes a Heat Shock Protein That Localizes to both the Mitochondria and Cell Wall of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukar. Cell.* 379–390.
- Bidochka, M.J., Tong, K.I. & Khachatourians, G.G. (1993). Partial purification and characterization of two extracellular N-acetyl-D-glucosaminidases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Can. J. Microbiol.* **39**: 41-45.
- Bonfim, S.M.R.C., Cruz, A.H.S., Jesuino, R.S.A. Ulhoa, C.J., Molinari-Madlum, E.E.W.I., Soares, C.M.A. & Pereira, M. (2006) Chitinases from *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular cloning, structural, phylogenetic, expression and activity analysis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **46**: 269-283.

- Borba, C.M. & Schäffer, G.M.V. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and an attempt to induce the dimorphism process with fetal calf serum. *Mycosis*. **45**: 174-179.
- Brummer, E., Castañeda, E. & Restrepo, A. (1993). Paracoccidioidomycosis: An Update. *Clin. Microbiol.* **6**: 87-117.
- Bulawa, C.E. (1993). Genetics and Molecular Biology of Chitin Synthesis in Fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 505-34.
- Camargo, Z.P. & Franco, M.F. (2000). Current Knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Ver. Iberoam. Micol.* **17**: 41-48.
- Cannon, R.D., Niimi, K., Jenkinson, H.F. & Shepherd, M.G. (1994). Molecular cloning and expression of the *Candida albicans* β -N-acetylglucosaminidase (HEX1) gene. *J. Bacteriol.* **176**: 2640-2647.
- Carbonell, L.M. (1969). Ultrastructure of dimorphic transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol.* **100**: 1076-1082.
- Cheng, Q., Li, H., Merdek, K., & Park, J.T. (2000). Molecular Characterization of the β -N-Acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and Its Role in Cell Wall Recycling. *J. Bacteriol.* **182**: 4836-4840.
- Clemons, K.V. Stevens, D.A. (1990). Interactions of mammalian steroid hormones with *Paracoccidioides brasiliensis*: estradiol receptor binding and mediation of cellular functions. *Interciencia* **15**: 206-208, 1990.
- Cock, A.M., Cano, E.L., Vélez, D., Aristizábal, B.H., Trujillo, J. & Restrepo, A. (2000). Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable *Paracoccidioides brasiliensis* propagules. *Scielo*. **42**: 59-66.
- Conti Díaz, I. A. (2007). On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*: our hypothesis of 1989: present status and perspectives. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. **49**: 131-134.
- Conti-diaz, I., & Rilla, F.D. (1989). Hipótesis sobre el nicho ecológico de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev. Med. Uruguay*. **5**: 97-103.
- Corredor, G.G., Peralta, L.A., Castaño, J.H., Zuluaga, J.S., Henao, B., Arango, M., Tabares, A.M., Matute, D.R., McEwen, J.G., Restrepo, A. (2005). The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Med Mycol.* May;43(3):275-80.

- Dahiya, N. Tewari, R. Hoondal. G.S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**: 773-782.
- De La Cruz, J., Rey, M., Lora, J.M., Hidalgo-Gallego, A., Domínguez, F., Pintor-Toro, J.A., Llobell, A. & Benitez, T. (1992). Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *Eur. J. Biochem.* **206**: 859-867.
- De Marco, J.L., Valadares-Inglis, M.C. & Felix, C.R. (2004) Purification and characterization of an *N*-acetylglucosaminidase produced by a *Trichoderma harzianum* strain which controls *Crinipellis pernicioso*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 70-75.
- Diez, B., Rodriguez-Saiz, M., de la Fuente J.L., Moreno, M.A. & Barredo, J.L. (2005). The *nagA* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding beta-N-acetylglucosaminidase. *J. FEMS Microbiol. Lett.* **242**: 257–264.
- Draborg, H., Kauppinen, S., Dalboge, H. & Christgau, S. (1995). Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* exochitinases from *Trichoderma harzianum*. *Biochem Mol Biol Int.* **36**: 781-791.
- Duo-Chuan, Li. (2006). Review of fungal chitinases. *Mycopathol.* **161**: 345–360.
- Escott, G.M., Hearn, V.M. & Adams, D.J. (1998). Inducible chitinolytic system of *Aspergillus fumigatus*. *Microbiol.* **144**: 1575-1581.
- Ferreira, M.S., Freitas L.H., Lacaz, C.S., Del Negro, G.M., Aiello, N.T., Garcia, M.N., Assis, C.M., Salebian, A. & Heris-Vaccari, E.M. (1990). Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strains from dogs food probably contaminated with soil in Uberlândia. Brazil. *J. Med. Vet. Mycol.* **28**: 253-256
- Flach, J., Pilet, P.E. & Jolles, P. (1992). What's new in chitinase research? *Experientia* **48**: 701-716.
- Fleet, G.H. (1991). Cell walls, 199-277. In Rose, A.H. & Harrison, J.S. (eds), *The yeast*, 2nd ed., vol 4. Academic Press, Ltd., London, United Kingdom.
- Franco, M. Peraçoli, M.T., Soares, A., Montenegro, M.R., Mendes, R.P., Meira, D.A. (1993). Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Micol.* **5**: 115-149.
- Ganiko, L., Puccia, R., Mariano, V.S., Sant'Anna, O.A., Freymuller, E., Roque-Barreira, M.C., Travassos, L.R. (2007). Paracoccin, an N-acetyl-glucosamine-binding lectin of *Paracoccidioides brasiliensis*, is involved in fungal growth. *Microbes Infect.* **9**: 695-703.

- Geimba, M.P, Riffel, A. & Brandelli, A. (1998). Purification and characterization of β -N-acetylhexosaminidase from the phytopathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana*. *J. Appl. Microbiol.* **85**: 708–714.
- Georgopapadakou, N.H. & Tkacz J.S. (1995). The fungal cell wall as a drug target. *Trends Microbiol* **3**: 98-104.
- Gezuele, E. (1989). Aislamiento de *Paracoccidioides brasiliensis* sp de heces de pinguino en la Antártida. Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomicosis. Caracas. (*Conference Proceeding*).
- Ghormade, V.S., Lachke, S.A. & Deshpande, M.V. (2000). Dimorphism in *Benjaminiella poitrasii*: involvement of intracellular endochitinase and N-acetylglucosaminidase activities in the yeast-mycelium transition. *Folia Microbiol.* **45**: 231–238.
- González, A., Gómez, B.L., Diez, S., Hernández, O., Restrepo, A., Hamilton, A.J. & Cano, L.E. (2005). Purification and Partial Characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* Protein with Capacity To Bind to Extracellular Matrix Proteins. *Infec. and Imm.* 2486–2495.
- Gooday, G.W., Zhu, W.Y. & O'Donnell, R.W. (1992). What are the roles of chitinases in the growing fungus? *FEMS Microbiol. Lett.* **100**: 387-392.
- Graham, T.R., Zassenhaus, H.P., Kaplan, A. (1988). N,N'-Diacetylchitobiase of *Vibrio Harvey*. *J. Biol. Chem.* **263**: 16823-16829.
- Grose, E., Tamsitt, J.R. (1965). *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of 3 bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia. *Sabouraudia.* **4**: 125
- Harman, G.E., Hayes, C.K., Lorito, M., Broadway, R.M, Di Pietro, A., Peterbauer, C. & Tronsmo, A. (1993). Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathol.* **83**: 313–318.
- Henrissat B., Bairoch A (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino- acid sequence similarities. *Biochem. J.* **293**:781-788.
- Henrissat B., Bairoch A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316**: 695-696.
- Henrissat, B. & Davies, G. J. (2000). Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases. Families, Modules, and Implications for Genomics. *Plant Physiology.* **124**:1515-1519.
- Higgins, D.G & Sharp, P.M (1998). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* **73**: 237-244.

- Irhuma, A., Gallagher, J., Hackett, T.J. & McHale, A.P., (1991). Studies on N-acetylglucosaminidase activity produced by *Streptomyces hygroscopicus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1074**: 1-5.
- Izard, J.W. & Kendall, D.A. (1994). Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. *Mol Microbiol* **13**: 765-773.
- Jenkinson, H.F. & Shepherd, M.G. (1987). A mutant of *Candida albicans* deficient in β -N-acetylglucosaminidase (chitinase). *J. Gen. Microbiol.* **133**: 2097-2106.
- Johnson, W.D. & Lang, C.M. (1977). Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) in squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Vet. Pathol.* **14**: 368-371.
- Kanetsuna, F. (1981). Ultrastructural studies on the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces demartitidis* and *Histoplasma capsulatum*. *Sabouraudia.* **19**: 275-286.
- Kanetsuna, F., Carbonell, L.M., Moreno, R.E. & Rodriguez, J. (1969). Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol.* **3**: 1036-1041.
- Kanetsuna, F.; Carbonell, L.M.; Azuma, I. & Yamamura, Y. (1972). Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol.* **110**: 208-218.
- Kim, S., Matsuo, I., Ajisaka, K., Nakajima, H. & Kitamoto, K. (2002). Cloning and characterization of the nagA gene that encoded β -N-acetylglucosaminidase from *Aspergillus nidulans* and its expression in *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 2168–2175.
- Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiation codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell.* **144**:283-292.
- Kurokawa, C.S., Sugizaki, M.F., & Peraçoli, M.T.S. (1998). Virulence factors in fungi of systemic mycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **40**: 125-135.
- Lacaz, C.S. (1994). *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy. In: Franco, M., Lacaz, C.S., Restrepo-Moreno, A. & Del Negro, G. (Eds), *Paracoccidioidomycosis*, CRC Press, Boca Ratón, Chapter 2: 13-25.
- Larone, D.H. (1995). *Medically Important Fungi – A Guide to Identification* ASM Press, Washington, D.C.

- Li, D.C, Zhang, S.H, Liu, K.Q. & Lu, J. (2004). Purification and characterization of a chitinase from the mycoparasitic 355 fungus *Trichothecium roseum*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **50**: 35–39.
- Londero, A.T. & MELO, I.S. (1983). Paracoccidioidomycose in childhood. A critical review. *Mycopathol.* **82**: 49-55.
- Londero, A.T. & Ramos, C.D. (1990). Paracoccidioidomycose: estudo clínico-micológico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. *J. Pneumol.* **16**: 129-132.
- Londero, A.T. Paracoccidioidomycose (1986). Patogenia, formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. *J. Pneumol.* **12**: 41-57.
- Lutz, A. (1908). Uma mycose pseudo-coccidica localizada na boca e observada no Brasil: “Contribuição ao conhecimento das hiphoblastomycoses americanas.” *Bras-Méd.* **22**: 121-124.
- Marshall, R.D. (1972) Glycoproteins. *Annu Rev Biochem* **41**: 673-702. Mattar-Filho, R., Azevedo, M.O., Pereira, M., Jesuíno, R.S.A.; Salem-Izacc, S.M.; Brito, W.A.; Gesztesi, J.L.; Soares, R.B.A.; Felipe, M.S.S. & Soares, C.M.A. (1997). Expression of glycoprotein gp43 in stage-specific forms and during dimorphic differentiation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.* **35**: 341-345.
- Mendes-Gianini, M.J.S., Moraes, R.A., Ricci, T.A. (1990). Proteolytic activity of 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* **32**: 384-385.
- Miller, N.; Langston, Y.; Waterston, R. (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science.* **282**: 2012-2018.
- Mollinari-Madlum, E.E.W.I.; Felipe, M.S.S. & Soares, C.M.A. (1999). Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Med. Vet. Mycol.* **37**: 269-276.
- Molloy, C.; Cannon, R.D.; Sullivan, P.A. & Shepherd, M.G. (1994). Purification and characterization of two forms of N-acetylglucosaminidase from *Candida albicans* showing widely different outer chain glycosylation. *Microbiology.* **140**: 1543-1553.
- Montenegro, M. & Franco, M. (1994). Pathology. In: Franco M, Lacaz C.S, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. (eds). Paracoccidioidomycosis. Boca Rato’n, FL: CRC Press, 131-150.

- Moreno, R.E.; Kanetsuna, F. & Carbonel, L.M. (1972). Isolation of chitin and glucan from the cell wall of the yeast from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **130**: 212-217.
- Muldoon, L.L., Neuwelt, E.A, Pagel, M.A. & Weiss, D.L. (1994). Characterization of the molecular defect in a feline model for type II GM2-gangliosidosis (Sandhoff disease). *Am. J. Pathol.* **144**: 1109-1118.
- Munro, C. A, Winter, K., Buchan, A., Henry, K., Becker, J. M, Brown, A. J., Bulawa, C. E., Gow, N. A. (2001). Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Mol Microbiol.* **39**: 1414-1126.
- Munro, C.A., Winter, K., Buchan, A., Henry, K., Becker, J.M., Brown, A.J.P., Bulawa, C.E., Gow, N.A.R. (2001). Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Mol. Microbiol.* **39**: 1414-1426.
- Negróni, P. (1966). El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo argentino. *Prensa Med.* **53**:2831-2832.
- Niño-Vega, G.A., Munro, C.A., San Blas, G., Gooday, G.W. & Gow, N.A.R. (2000). Differential expression of chitin synthase genes during temperatureinduced dimorphic transitions in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* **38**: 31-39.
- Nino-Veja, G., Perez-Silva, C., San-Blas, G. (2007). The actin gene in *Paracoccidioides brasiliensis*: organization, expression and phylogenetic analyses. *Mycol Res.***111**: 363-369.
- Nombela, C., Molina, M., Cenamor, R. & Sanchez, M. (1988). Yeast beta-glucanases: a complex system of secreted enzymes. *Microbiol. Sci.* **5**: 328-332.
- Nunes, L. R, Costa de Oliveira R, Leite, D. B, da Silva, V. S, dos Reis Marques, E, da Silva Ferreira, M. E, Ribeiro, D.C, de Souza Bernardes, L. A, Goldman, M. H, Puccia, R., Travassos, L. R, Batista, W. L, Nobrega, M. P., Nobrega, F. G., Yang, D.Y., de Braganca Pereira, C. A., Goldman, G. H. (2005). Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot Cell.* **4**: 2115-2128.
- Peberdy, J.F. (1990). Fungal cell - a review. In: Kuhn P.J., Trinci, A.C.P., Jung, M.J., Goosey, M.W. & Copping L.G. (eds) *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 5-30.

- Pera, L.M.; Majollí, M.V.I. & Baigori, M.D. (1997). Purification and characterization of a thermostable and highly specific β -N-acetyl-D-glucosaminidase from *Aspergillus niger* 419. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **26**: 183-187.
- Peterbauer, C.K., Lorito, M., Hayes, C.K., Harman, G.E., Kubicek, C.P. (1996). Molecular cloning and expression of *nagI*, a gene encoding N-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Curr. Genet* **30**: 325-331.
- Plihal, O., Sklenar, J., Kmonickova, J., Man, P., Pompach, P., Havlicek, V., Kren, V. & Bezouska, K. (2004). N-glycosylated catalytic unit meets O-glycosylated propeptide: complex protein architecture in a fungal hexosaminidase. *Bioch. Soc. Trans.* **32**: 764–765.
- Pugh, D., & Cawson (1977) The cytochemical localization of acid hydrolases in four common fungi. *Cell. Mol. Biol.* **22**: 125-132. Sullivan, P.A.; Mc Heigh, D.J.; Komane, L.K. & Shephed, M.G. (1984). The secretion of N-acetylglucosaminidase during germ-tube formation in *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 2213-2218.
- Rappleye, C.A., Eissenberg, L. G., Goldman, W.E. (2007). Histoplasma capsulatum alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**: 1366-70.
- Rappleye, C.A., Engle, J.T., Goldman, W.E. (2004). RNA interference in Histoplasma capsulatum demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. *Mol Microbiol.* Jul;53(1):153-65.
- Restrepo, A. (1985). The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *J. Med. Vet. Mycol.* **23**: 323-334
- Restrepo, A. (2000). Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: implications for the prolonged latency of paracoccidioidomycosis? *Med. Mycol.* **38**: 317-322.
- Ricci, G., Mota, F.T. & Wakamatsu, A. (2004). Canine paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol.* **42**: 379–383.
- Rivitti, E.A. & Aoki, V. (1999). Deep fungal infections in tropical countries. *Clin. Dermatol.* **17**: 171-190.
- Román, E., Arana, D.M., Nombela, C., Alonso-Monge, R. & Pla, J. (2007). MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *TRENDS in Microbiol.* **15**: 181-190.

- Ruiz Herrera, J. (1991) Biosynthesis of β -glucans in fungi. *Antonie Leuwenhoek* **60**: 72-81.
- Sahai, A.S. & Manocha, M.S. (1993). Chitinases of fungi and plantas: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiol. Rev.* **11**: 317-338.
- Salem-Izaac, S.M., Jesuino, R.S.A., Brito, W.A., Pereira, M., Felipe, M. S.S. & SOARES C.M.A. (1997). Protein synthesis patterns of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in stage-specific forms and during cellular differentiation. *J. Med. Vet. Mycol.* **35**: 205-211.
- San-Blas, F., De Marco, G. & San-Blas, G. (1981). Isolation and partial characterization of a growth inhibitor of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia.* **20**: 159-68.
- San-Blas, G. & San-Blas, F. (1977). *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. *Mycopathol.* **62**: 77-86.
- San-Blas, G., Restrepo, A., Clemons, K., Stevens, D.A., San-Blas, F., Puccia, R., Travassos, L.R., Figueroa, J.I., Hamilton, A.J. & Bartholomew, M.A. (1992). Paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* **30**: 59-71.
- San-Blas,G. (1982). The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in hostparasite relationship. *Rev Mycopathol.* **79**: 159-184.
- Sano, A.; Nishimura, K. & Miyaji, M. (1999). The research encouragement award. Effects of sex hormones on sexual difference of experimental paracoccidioidomycosis. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **40**: 1-8.
- Santos, M.O., Pereira, M., Felipe, M.S.S. Jesuino, R.S.A., Ulhoa, C. J., Soares, R.BA. & Soares, C.M.A. (2004). Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the N-acetyl- β -D-glucosaminidase homologue of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* **42**: 247-253.
- Shen, H.D., Liaw, S.F., Lin, W.L., Ro, L.H., Yang, H.L. & Han, S.H. (1995). Molecular cloning of cDNA coding for the 68 kDa allergen of *Penicillium notatum* using MoAbs. *Clinical and Experimental Allergy.* **25**: 350-356.
- Shome, S.K. & Batista, A.C. (1963). Occurence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil in Recife, Brazil. *Rev. Fac. Med. Univ. Federal Ceará.* **3**:90-94
- Silva, C.L. & Lowrie, D.B. (1994). A single mycobacterial protein (hsp65) expressed by a transgenic antigen-presenting cell vaccinates mice against tuberculosis. *Immunology.* **82**: 244-248.

- Silva, M. B., Marques, A. F., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., Travassos, L. R., Taborda, C. P. (2006). Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect.* **8**: 197-205.
- Silvestre, M.T.A. Ferreira, M.S., Borges, A.S., Rocha, A., Souza, G.M. & Nishioka, S.A. (1997). Monoartrite de Joelho como Manifestação Isolada de Paracoccidioidomicose. *Scielo.* **30**: 293-295.
- Soares, R.B.A. (1999). Purificação e caracterização de N-acetil- β -D-glicosaminidase do fungo patogênico humano *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Goiás.
- Stover, E.P.; Shar, G.; Clemons, K.V.; Stevens, D.A. & Feldman, D. (1986). Estradiol-binding-proteins form mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect. Immun.* **51**: 199-203.
- Svidzinski, T.I.E., 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. *Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **41**: 279-283.
- Syntin, P., Dacheux, F., Druart, X., Gatti, J.L., Okamura, N. & Dacheux, J.L. (1996). Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. *Biol Reprod.* **55**: 956-74.
- Taylor, G., Jabaji-Hare, S., Charest, P.M. & Khan, W. (2002) Purification and characterization of an extracellular exochitinase, β -N-acetylhexosaminidase, from fungal mycoparasite *Stachybotrys elegans*. *Can. J. Microbiol.* **48**: 311–319.
- Tews, I., Vincentelli, R., & Vorgias, C.E. (1996). N-Acetylglucosaminidase (chitobiase) from *Serratia marcescens*: gene sequence, and protein production and purification in *Escherichia coli*. *Gene* **170**: 63-67.
- The *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome database:
[<https://dna.biomol.unb.br/Pb/>]
- Triggs-Raine, B.L., Akerman, B.R., Clarke, J.T. & Gravel, R.A. (1991). Sequence of DNA flanking the exons of the HEXA gene, and identification of mutations in Tay-Sachs disease. *Am J Hum Genet.* **49**: 1041-54.
- Tsujibo, H., Hatano, N., Mikami, T., Hirasawa, A., Miyamoto, K. & Inamori, Y. (1998). A novel beta-N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-

- 520: Gene cloning, expression, and assignment to family 3 of the glycosyl hydrolases. *Appl Environ. Microbiol.* **64**: 2920-2924.
- Ueda, M. & Arai, M. (1992). Purification and some properties of β -N-acetylglucosaminidase from *Aeromonas sp.* 10S-24. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* **56**: 1204-1207.
- Ulhoa, C.J. & Peberdy, J.F. (1991). Purification and characterization of an extracellular chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Curr. Microbiol.* **23**: 285-289.
- Ulhoa, C.J. & Peberdy, J.F. (1992). Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enz. Microb. Technol.* **14**: 236–241.
- Ulhoa, C.J., Sankievicz, D., Limeira, P.S. & Peberdy, J.F. (2001) Effect of tunicamycin on N-acetyl- β -D-glucosaminidase produced by *Trichoderma harzianum*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1528**: 39–42.
- 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.
- Vigna, A.F., Almeida, S.R., Xander, P., Freymüller, E. & Mariano, M., Lopes, J.D. (2006). Granuloma formation in vitro requires B-1 cells and is modulated by *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 antigen. *Microbes and Infection.* **20**: 1-9.
- Villa, L.A., Tobón, A., Restrepo, A., Calle, D., Rosero, D.S., Gómez, B.L. & Restrepo, A. (2000). Central nervous system *Paracoccidioidomycosis*. Report of a case successfully treated with itraconazol. *Scielo.* **42**: 231-234.
- Villar, L.A., Salazar, M.E. & Restrepo, A. (1988). Morphological study of a variant of *Paracoccidioides brasiliensis* that exists in the yeast form at room temperature. *J. Med. Vet. Mycol.* **26**: 269-276.
- Watanabe, T., Kanai, R., Kawase, T., Tanabe, T., Mitsutomi, M., Sakuda, S. & Miyashita, K. (1999). Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. *Microbiology.* **145**: 3353-3363.
- Wu, Y., Egerton, G., Underwood, A.P., Sakuda, S. & Bianco, A.E. (2001). Expression and secretion of a larval-specific chitinase (family 18 glycosyl hydrolase) by the infective stages of the parasitic nematode, *O. volvulus*. *J. Biochem.* **276**: 42557-42564.

Zhu, B.C., Lo, J.I., Li, Y.T., Li, S.C., Jaynes, J.M., Gildemeister, O.S., Laine, R.A. & Ou, C.Y. (1992). β -N-acetylhexosaminidase from *Streptomyces* species. *J. Biochem.* **112**: 163-167.