



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

Patrícia Kott Tomazett

**ANALISE DA RESPOSTA DE *Paracoccidioides brasiliensis*
A DIFERENTES TIPOS DE AGENTES ESTRESSORES
E OSMOREGULADORES E EXPRESSÃO HETERÓLOGA E
LOCALIZAÇÃO DE β -1, 3-GLICANA SINTASE**

Orientadora: Maristela Pereira

Tese de Doutorado

Goiânia-GO, 2010



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Patrícia Kott Tomazett

Análise da resposta de *Paracoccidioides brasiliensis* a diferentes
tipos de agentes estressores e osmoreguladores e expressão
heteróloga e localização de β -1.3-glicana sintase

Orientadora: Maristela Pereira

Tese de Doutorado

Goiânia-GO, 2010

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Patrícia Kott Tomazett		
E-mail:	patriciakt@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não			
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:	Cons. Nac. Des. Cient. Tecnol.	Sigla:	CNPq
País:	Brasil	UF:	GO CNPJ:
Título:	Análise da resposta de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> a diferentes tipos de agentes estressores e osmoreguladores e expressão heteróloga e localização de β-1.3-glicana sintase		
Palavras-chave:	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>, parede celular, stress celular, expressão heteróloga		
Título em outra língua:	Analysis of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> response to different stressor agents and osmoregulators and heterologous expression and localization of β-1.3-glucan synthase		
Palavras-chave em outra língua:	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>, cell wall, cell wall stress, heterologous expression		
Área de concentração:	Microbiologia		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	26/02/2010		
Programa de Pós-Graduação:	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública		
Orientador (a):	Maristela Pereira		
E-mail:	mani@icb.ufg.br		
Co-orientador (a):*			
E-mail:			

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ ☒ total ☐ parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

☐ Capítulos. Especifique: _____

☐ Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Assinatura do (a) autor (a) _____

Data: ____ / ____ / ____

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Patrícia Kott Tomazett

**Análise da resposta de *Paracoccidioides brasiliensis* a diferentes tipos de agentes
estressores e osmoreguladores e expressão heteróloga e localização de β -1.3-glicana
sintase**

Orientadora: Maristela Pereira

Tese submetida ao PPGMT/UFG como requisito parcial para obtenção do Grau de
Doutor, na área de concentração de Microbiologia.

Apoio Financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
(CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e International Foundation for
Sciences (IFS).

Goiânia-GO, 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GT/BC/UFG

T655a	Tomazett, Patrícia Kott. Análise da resposta de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> a diferentes tipos de agentes estressores e osmoreguladores e expressão heteróloga e localização de β-1.3-glicana sintase [manuscrito] / Patrícia Kott Tomazett. - 2010. 119 f. : il. Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maristela Pereira. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2010. Bibliografia. Inclui lista de abreviaturas. 1. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> 2. Agentes estressores I. Título. CDU: 616.993.19
-------	--

**Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências
Biológicas, Universidade Federal de Goiás.**

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Maristela Pereira – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dr. Carlos Roberto Félix – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

Prof. Dr. Henrique Leonel Lenzi – Departamento de Patologia, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Profa. Dra. Nadya da Silva Castro – Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Universidade Federal de Goiás/Campus Jataí.

Prof. Dr. Roberto do Nascimento Silva – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

SUPLENTE:

Profa. Dra. Sílvia Maria Salem Isacc – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Dr. Clayton Luiz Borges - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Dra Juliana Parente - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Profa. Dra. Célia Maria Almeida Soares – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

*“Sapientia: nenhum poder, um
pouco de saber e o máximo de
sabor...”*

Barthes

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida:

Minha mãe, Maria Cristina, por ser um exemplo de força, dedicação e amor;

Meu pai, Lourenço, por ser meu herói, meu suporte e por me apoiar em todas as minhas decisões;

Às minhas irmãs, Juliana e Lorena pelo apoio, amor, confiança, companheirismo e simplesmente por vocês existirem na minha vida! Vocês são minhas jóias mais preciosas!

À minha madrastra Vanessa e ao meu irmão Giovanni pelo cuidado, cumplicidade, torcida e pelo carinho.

Sem vocês eu não conseguiria! Muito obrigada por tudo! A vocês eu dedico esta vitória!

Agradecimentos

À Deus! Por ser luz na minha vida, pai misericordioso e por me fazer acreditar que eu conseguiria!

À Profa Dra Maristela Pereira pela confiança, orientação, investimento e por acreditar em mim e no nosso trabalho. Agradeço pela sua dedicação, por tornar nossa convivência muito agradável e por se tornar um exemplo de dedicação e competência para mim. Tenho muita admiração e orgulho de você! Seus ensinamentos foram muito além da área acadêmica e científica!

À Profa Dra Célia Maria de Almeida Soares pela competência e sensatez na coordenação do Laboratório de Biologia Molecular-UFG, pelo suporte dado e por toda a colaboração realizada no nosso trabalho.

Ao Prof Dr Carlos Roberto Félix pelo acolhimento no Laboratório de Enzimologia-UnB, pela paciência e prontidão na realização dos experimentos de atividade enzimática, por compartilhar seu conhecimento comigo e pelo carinho e amizade que sempre teve durante nosso trabalho.

Ao Prof Dr Henrique Leonel Lenzi pelos experimentos de microscopia confocal realizados no laboratório de Patologia da Fio Cruz, pelas fotos lindas que iremos publicar e principalmente pela adorável atenção nos momentos que passei no RJ e por me mostrar que se fizermos as coisas com amor tudo vale a pena. O senhor mudou minha forma de pensar na ciência e na vida e sou eternamente grata!

À Profa Dra Nadya Silva Castro pela colaboração nos experimentos de PCR em tempo real, pela prontidão e vontade de ajudar sempre no laboratório, pelo carinho e pela amizade! Você faz muita falta, Nadica!

À Profa Dra Fabrícia Paula pela colaboração na obtenção da proteína recombinante, desvendando os “egnimas” da PbFKS sempre com prontidão e simpatia.

Ao Prof Dr Cirano e Prof Dr Roberto Nascimento pelos ensinamentos desde a graduação, pelas colaborações no meu trabalho e por estarem dispostos e pacientes para tirar minhas dúvidas sempre que eu precisei.

À Profa. Dra Silvia Maria Salem Isacc pelas discussões realizadas sobre meu trabalho na qualificação e pelos ótimos momentos de convivência no laboratório.

Às Prof. Dras Daniela de Melo e Silva e Ângela Adamski da Silva Reis do núcleo de pesquisa replicon da UCG por terem autorizado que eu utilizasse o sistema iQ5 para realização dos experimentos de qRT-PCR e pela simpatia e prontidão.

Ao Prof Dr Edvaldo, aos Ms Daniel, Gil, Yara e Félix e à Marisia e Margarete do Laboratório de Enzimologia da UnB. Agradeço pelo acolhimento no laboratório todas as vezes que eu precisei “hospedar” no laboratório de vocês e também pela amizade e simpatia.

Ao Prof Dr Marcelo Pelajo, Ms Pedro Henrique e Dra Ester do Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz por me darem todo o apoio que eu precisei durante os experimentos de microscopia na Fio Cruz e principalmente ao querido Bernardo Pascarelli pela paciência ao examinar as lâminas no confocal, pelas conversas e pelos passeios pelo Rio de Janeiro.

Ao Dr. Gustavo Rezende do laboratório de fisiologia e controle de artrópodes vetores da Fio Cruz que gentilmente me cedeu uma alíquota do fluoróforo WGA-FITC possibilitando meus experimentos de microscopia.

Ao meu amado e eterno amigo Bruno Tacco por ter sido o culpado pela minha ida ao LBM-UFG, por estar ao meu lado por todo este tempo desde a graduação, pela amizade, carinho e por ter acreditado em mim.

À doutoranda Renata Silva do Prado e às mestrandas Mariana Vieira Tomazett e Amanda Gregorim, minhas queridas amigas, flores que eu considero como irmãs. Agradeço a vocês pelo apoio, principalmente nos últimos meses do meu trabalho, pelo carinho, pelas conversas, pelos momentos de muita alegria e pelos conselhos. Vocês

estarão guardadas no meu coração eternamente e poderão contar com o meu apoio e minha amizade sempre que precisarem! Amo vocês!

Aos Drs Alexandre Melo Bailão, Juliana Alves Parente e Clayton Luis Borges. Agradeço muito a vocês que desde a minha entrada no LBM-UFG estiveram de prontidão para tirarem dúvidas, discutirem protocolos, auxiliarem nos trabalhos e, agora, por aceitarem participar como suplentes da banca de defesa do meu trabalho (o Alex aceitou na qualificação). Obrigada por compartilharem seu conhecimento comigo e também pela amizade e pelo carinho. Vocês são pessoas de ouro!

Às doutorandas Patrícia Fernanda Zambuzzi e Kelly Pacheco, queridas amigas! Obrigada pelas discussões nos trabalhos, pelas colaborações, pelos excelentes momentos de conversas pelo carinho e pela amizade! Isso foi muito importante para mim durante todo meu trabalho.

Aos doutorandos Sarah Nogueira e Benedito Neto, agradeço pela disposição e simpatia de vocês, seja na hora de ajudar com algum experimento, na discussão de protocolos e burocracias do lab. Obrigada também pela amizade sincera e pela SALSA!!!!!! Vocês estão guardados no meu coração!

Aos amigos do lab Simone Weber, Tereza Cristina, Ana Flávia Parente, Ronney Chagas, Patrícia Lima, Elisa Flávia Bailão, Mirelle Garcia, Hellen Paula, Dayane e Leandro que colaboraram com discussões de papers, protocolos, receitas e sobre a vida!!. Obrigada pela amizade de vocês!

Aos Drs Wesley Brito, Luís Augusto e Mônica de Oliveira, amigos que não estão mais no laboratório, mas cuja presença foi marcante durante meu trabalho! Obrigada por compartilhar sua sabedoria comigo, por tirar minhas dúvidas (infindáveis) com paciência e pelos incríveis momentos de farra!!!!

Às Ms. Lidiane Santana e Sheyla Bonfim que me ajudaram muito no laboratório no início do meu trabalho e se tornaram minhas grandes amigas que eu sei que sempre poderei contar e que poderão sempre contar comigo!

Aos amigos do Laboratório de Enzimologia da UFG Saulo José, Marcelo Ramada, Andrei Stecca e Amanda pela simpatia e pela prontidão todas as vezes que eu precisei de algo do laboratório.

Aos professores e funcionários do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública pelos ensinamentos e pelo suporte para que fosse possível finalizar a tese.

Aos membros da Dançarte Cia de Dança por estarem presentes na minha vida durante meu trabalho no laboratório, por torcerem por mim e pelo carinho e amizade essenciais neste período.

A todos que de alguma forma participaram ou contribuíram para a realização deste trabalho eu agradeço de coração!

Lista de abreviaturas

AI: álcali insolúvel

AS: álcali solúvel

cAMP: adenosina monofosfato cíclica

CFW: calcofluor white

CR: vermelho congo

FISS: fração de carboidratos solúveis em álcali

GDP: guanina difosfato

GEF: fator de troca GDP-GTP

Glc: glicose

GlcNAc: N-acetil-D-glicosamina

GPI: glicosilfosfatidilinositol

GTP: guanin trifosfato

HTM: hélice transmembrana

IPC: integridade da parede celular

ITS: internally transcribed spacer

kDa: kiloDalton

Man: manose

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

ODC: ornitina descarboxilase

PAMP: padrão molecular associado à patógeno

Pb01, *Pb03* e *Pb18*: isolado 01, 03 e 18 de *Paracoccidioides brasiliensis*

PCM: paracoccidioidomicose

PCR: reação em cadeia da polimerase

PKA: proteína quinase A

pH: potencial hidrogeniônico

PRR: receptores de reconhecimento do padrão

qRT-PCR: PCR quantitativa acoplada à transcrição reversa

rRNA: ácido ribonucleico ribossômico

SDS: dodecil sulfato de sódio

TNF- α : fator de necrose tumoral α

UDP: uridina difosfato

Sumário

DEDICATÓRIA	IX
AGRADECIMENTOS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
SUMÁRIO	XVI
RESUMO	XVIII
ABSTRACT	XIX

CAPÍTULO I – Considerações gerais

I. INTRODUÇÃO	20
I.1. Aspectos gerais de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	20
I.2. PCM	21
I.3. Dimorfismo	23
I.4. Parede celular	25
I.5. Proteínas envolvidas na biossíntese da parede celular	31
I.5.1. β -1,3-glicana sintase	31
I.5.2. Biossíntese de quitina	36
I.5.3. β -1,3-glicosiltransferase 3	39
I.6. Integridade da parede celular	40
II. JUSTIFICATIVA	45
III. OBJETIVOS	46

CAPÍTULO II – Manuscrito: Response of *Paracoccidioides brasiliensis* to stressor agents and cell wall osmoregulators

Response of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> to stressor agents and cell wall	47
---	----

osmoregulators

CAPÍTULO III – Manuscrito: 1,3-β-D-glucan synthase of

***Paracoccidioides brasiliensis*: recombinant protein, expression and
cytolocalization in the yeast and mycelium phases**

1,3-β-D-glucan synthase of *Paracoccidioides brasiliensis*: recombinant 74
protein, expression and cytolocalization in the yeast and mycelium phases

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS 105

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 108

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo patogênico e termodimórfico que se apresenta na forma de micélio a 23°C (forma infectante) e na forma de levedura a 37°C (forma parasitária). A parede celular de fungos é capaz de alterar sua composição e até mesmo sua estrutura em resposta a condições ambientais de estresse através de mecanismos compensatórios. As proteínas envolvidas nestes mecanismos são possíveis alvos para o desenvolvimento de agentes antifúngicos específicos. Em *P. brasiliensis*, os principais polímeros que constituem a parede celular são glicanas e quitina. Estes polímeros formam uma barreira primária que é responsável pela integridade estrutural e forma da parede celular. Neste trabalho, o comportamento de *P. brasiliensis* diante de situações de estresse foi investigado com o intuito de estudar, pela primeira vez, os mecanismos utilizados por este fungo na manutenção da integridade da parede celular. Nossos resultados mostram que células leveduriformes de *P. brasiliensis* são sensíveis aos agentes estressores da parede celular calcofluor white (CFW), congo red (CR), SDS, NaCl, KCl e sorbitol. Houve um aumento na expressão de transcritos de *PbFKS1* e no conteúdo do polímero de β -1,3-glicana na parede celular após tratamento com todos os agentes estressores. Após tratamento com SDS e KCl a expressão de transcritos de *PbGFA1* assim como o conteúdo de resíduos de GlcNAc na parede celular também aumentaram. A expressão dos transcritos de *PbGEL3* também foi avaliada estando aumentada após tratamento com CFW, NaCl e sorbitol. Desta forma, mostramos que estas moléculas estão envolvidas na manutenção da parede celular diante de situações de estresse. Além destas análises, a proteína recombinante *PbFks1pc* ativa foi obtida. Através do anticorpo anti-*PbFks1pc* realizamos ensaios de imunocitocalização. Estes experimentos revelaram a presença de *PbFks1p* em regiões de crescimento apical no micélio e na superfície celular em células leveduriformes.

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis is a thermo-dimorphic human pathogenic fungus that lives at 23°C in the mycelium phase (infecting phase) and at 37°C in the yeast phase (parasite phase). In attempt to survive, the cell wall of fungi can change its composition and/or structure in response to environmental stress by compensatory mechanisms. The molecules involved in these mechanisms are possible target for the development of effective antifungal agents. In *P. brasiliensis*, the main components of the cell wall are glucans and chitin polymers. These polymers make a primary barrier that is responsible for the structural integrity and form of the cell wall. In this work the behavior of *P. brasiliensis* was evaluated against stress conditions with the aim of study, for the first time, the mechanisms used by this fungus in the maintenance of the cell wall integrity. Our results shown that *P. brasiliensis* yeast cells are sensitive to cell wall stressors calcofluor white (CFW), congo red (CR), SDS, KCl, NaCl and sorbitol. There was an increase in the *PbFKS1* transcripts expression and in the content of cell wall β -1,3-glicana after treatment with all stressor agents. After treatment with SDS and KCl the *PbGFA1* transcripts expression and the cell wall GlcNAc residues also increased. The transcript expression of *PbGEL3* was also evaluated being increased after treatment with CFW, NaCl and sorbitol. Thus we showed that these molecules are involved in the maintenance of the cell wall against stress conditions. Apart from these analyses we obtained the active recombinant protein *PbFks1pc*. Through the anti-*PbFks1pc* antibody we performed immunocitolocalization assays. These experiments revealed the localization of *PbFks1p* in regions of apical growth in the mycelium phase and in the cell surface in yeast phase.

Capítulo I

Considerações Gerais

I. INTRODUÇÃO

I.1. Aspectos gerais de *Paracoccidioides brasiliensis*

O fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado pela primeira vez em 1908, por Adolpho Lutz, é o agente etiológico de uma micose humana sistêmica conhecida por paracoccidioidomicose (PCM) (Franco, 1987; San-Blas, 1993). *P. brasiliensis* apresenta-se sob a fase miceliana, a qual se presume que ocorra na natureza e *in vitro* em temperaturas inferiores a 28°C e sob a fase leveduriforme em tecidos infectados e *in vitro* em temperaturas de aproximadamente 36°C (Restrepo, 1985; San-Blas, 1993).

A fase miceliana de *P. brasiliensis* apresenta-se como hifas septadas, multinucleadas, com filamentos finos. À temperatura de 36°C o fungo promove a transição da estrutura filamentosa para uma estrutura globular, assumindo a forma de levedura (San-Blas, 1993). Esta seria sua forma parasítica, que assume características peculiares: apresenta brotamentos múltiplos, resultado de exoesporulação, membrana birrefringente, além de cromatina evidente. As células apresentam tamanhos heterogêneos caracterizando-se por células-mãe ovais ou arredondadas circundadas por brotamentos heterogêneos múltiplos também arredondados ou ovais (Almeida *et al.*, 2009). A morfologia única da levedura é determinante no diagnóstico laboratorial da PCM e em uma avaliação comparativa, se assemelha a uma "roda de leme" (Furtado *et al.*, 1967).

Sabe-se que *P. brasiliensis* pode ser isolado a partir de solos, como já realizado no Brasil (Montenegro *et al.*, 1996), na Venezuela (Albornoz, 1971) e na Argentina (Negroni, 1966). Além disso, também já foi descrito o isolamento de *P. brasiliensis* de

animais como no morcego frugívoro *Artibeus lituratus* (Greer and Bolanos, 1977), no pinguim da Antártida Uruguaiana *Pygoscelis adeliae* (Garcia *et al.*, 1993) e em três espécies de tatus, *Dasyopus novemcinctus*, *Dasyopus septemcinctus* e *Cabassous centralis* (Bagagli *et al.*, 2003; Corredor *et al.*, 2005). Estudos moleculares possibilitaram a detecção de *P. brasiliensis* em tecidos de animais mortos em rodovias como porco-da-índia (*Cavia aperea*), porco espinho (*Sphigurrus spinosus*), furão (*Gallictis vittata*), guaxinim (*Procyon cacrivorus*) e tatus (*Dasyopus sp*) (Richini-Pereira *et al.*, 2008; Bagagli *et al.*, 2008) indicando que a infecção em animais silvestres de áreas endêmicas é maior do que proposto inicialmente. A infecção natural em alguns animais selvagens e domésticos tem sido observada, e manifestações clínicas da doença foram relatadas em cachorros (Ricci *et al.*, 2004), sugerindo que estes animais podem ser importantes reservatórios naturais primários do fungo.

Taxonomicamente, *P. brasiliensis* era classificado como fungo imperfeito no filo Deuteromycota, classe Hyphomycetes, devido ao fato de suas estruturas sexuais não terem sido descritas. Entretanto, a partir de análises filogenéticas baseadas em dados moleculares como as subunidades do rRNA 28S (Leclerc *et al.*, 1994) e 18S (Bialek *et al.*, 2000), da região ITS (internally transcribed spacer) (Peterson *et al.*, 1998), assim como de genes de actina e de ornitina descarboxilase (ODC), aliadas com análises químicas complementares da estrutura fina de polissacarídeos solúveis (FISS), foi proposta outra classificação para *P. brasiliensis*. Estas análises sugerem que *P. brasiliensis*, juntamente com outros fungos dimórficos, tais como *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum* pertencem ao filo Ascomycota, à ordem Onygenales e à família Onygenaceae (San-Blas and Nino-Vega, 2008).

I.2. PCM

Acredita-se que a inalação dos propágulos aéreos seja a etapa inicial da infecção e que os mesmos se convertam em células leveduriformes nos pulmões (Franco, 1987; San-Blas *et al.*, 2002). Após instalação do fungo, ocorre formação de lesões que podem: (i) regredir com destruição do fungo, (ii) regredir apresentando fungos latentes ou quiescentes, podendo se desenvolver para PCM ativa posteriormente, ou (iii) progredir com o desenvolvimento dos sinais e sintomas da PCM (Lacaz, 1994).

A PCM é a micose humana sistêmica com maior índice de mortalidade no Brasil (Coutinho *et al.*, 2002). Os altos índices de testes dérmicos positivos (paracoccidioidina) (75%) na população adulta reforçam a importância desta micose nas áreas rurais endêmicas onde se estima que 10 milhões de indivíduos estejam infectados, 2% dos quais desenvolvem a doença (Restrepo *et al.*, 2001). As duas formas principais da PCM são a aguda e crônica. A aguda, também denominada forma juvenil, é a forma mais severa da doença, acomete principalmente jovens e crianças e representa 3 a 5% dos casos. A crônica, também denominada adulta, tem progressão mais lenta e representa mais de 90% dos casos (Franco, 1987).

A PCM apresenta distribuição geográfica restrita à América Latina, com maior incidência no Brasil, Colômbia e Venezuela (Wanke and Londero, 1994; Rivitti and Aoki, 1999). Estima-se que 80% dos casos descritos estejam no Brasil (Brummer *et al.*, 1993; Coutinho *et al.*, 2002). O país é considerado o maior centro endêmico desta micose sendo a PCM responsável por em média 171 mortes ao ano. Os estados das regiões Sudeste e Sul tiveram as taxas de mortalidade mais altas, sendo mais concentradas em São Paulo e Paraná. Em relação à idade e sexo, a maioria das mortes causadas pela doença ocorreu em indivíduos com idade entre 30-59 anos sendo a maioria do sexo masculino. A incidência da doença em homens foi 13:1 quando

comparada a das mulheres (Prado *et al.*, 2009). Acredita-se que o manejo da terra, realizado por homens na maioria das propriedades rurais, leva-os ao contato com propágulos do fungo aumentando a incidência da doença nesta população (Brummer *et al.*, 1993).

Estudos realizados na presença do hormônio 17- β -estradiol demonstraram que o número de células micelianas que transitaram para as células leveduriformes era menor do que na ausência do hormônio. Este hormônio, presente em mulheres em idade reprodutiva, confere resistência à infecção por *P. brasiliensis*, sendo um importante fator que justifica a menor incidência da doença em mulheres (Restrepo *et al.*, 1984). Ainda, (Felipe *et al.*, 2005) identificaram genes expressos diferencialmente na fase leveduriforme que possivelmente ligariam ao estradiol inibindo a transição de micélio para levedura.

1.3. Dimorfismo de *P. brasiliensis*

O processo dimórfico de fungos é uma adaptação às condições ambientais. Em *P. brasiliensis* a conversão para a fase de levedura é um requisito para a progressão da infecção (San-Blas and Nino-Vega, 2008). Além disso, o dimorfismo é um mecanismo de defesa importante para a adaptação de alguns fungos patogênicos às condições adversas do hospedeiro humano durante o estabelecimento da doença e invasão dos tecidos (Kurokawa *et al.*, 1998; San-Blas *et al.*, 2002; Nemecek *et al.*, 2006).

A transição dimórfica em *P. brasiliensis* está correlacionada com mudanças na composição, organização e estrutura da parede celular. Ao assumir a fase leveduriforme ocorre um aumento no conteúdo de quitina, e uma alteração no tipo de polímero de glicana. É descrito que a fase miceliana tem exclusivamente β -1,3-glicana e a fase

leveduriforme é composta de proximadamente 95% de α -1,3-glicana e apenas 5% de β -1,3-glicana (Kanetsuna *et al.*, 1969). Acredita-se que a morfogênese esteja associada à virulência do fungo, pois isolados que não possuem a capacidade de se diferenciar em leveduras não são virulentos (Borba and Schäffer, 2002). A quantidade de α -1,3-glicana também está relacionada à virulência, visto que isolados de *P. brasiliensis* com maior teor de α -1,3-glicana são mais virulentos. Acredita-se que este polímero, localizado mais externamente na parede celular, protegeria o polímero de β -1,3-glicana do reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro (Silva *et al.*, 1994; San-Blas, 1982).

As vias de transdução de sinal MAP kinases, Ca^{+2} /calmodulina e cAMP/PKA parecem exercer um importante papel no processo de diferenciação celular em fungos dimórficos e patogênicos. Em *P. brasiliensis*, a expressão da calmodulina e da subunidade regulatória da calcineurina mostraram-se aumentadas durante a transição dimórfica (Nunes *et al.*, 2005) da fase de levedura para a fase de micélio. Além disso, drogas que bloqueiam as quinases dependentes de Ca^{2+} /Calmodulina inibem a diferenciação de micélio para levedura (Carvalho *et al.*, 2003). A adição de cAMP exógeno é capaz de modular a transição de levedura para micélio mantendo assim a forma patogênica do fungo (Paris *et al.*, 1985).

Alguns estudos foram realizados visando uma melhor compreensão do metabolismo de *P. brasiliensis* na fase de micélio e de levedura. Nesse sentido, o transcriptoma diferencial do fungo foi estudado resultando no sequenciamento de 6022 genes expressos nas fases miceliana e leveduriforme. Foi observado que genes não homólogos a genes humanos como isocitrato liase e α -1,3-glucana sintase, considerados alvos para drogas antifúngicas foram ambos expressos preferencialmente na fase leveduriforme (Felipe *et al.*, 2003; Felipe *et al.*, 2005). A alta expressão de genes que codificam enzimas que participam da fosforilação oxidativa, como a isocitrato

desidrogenase e succinil coenzima-A sintase sugere que o micélio apresente metabolismo aeróbio. Já na fase leveduriforme, genes como álcool desidrogenase I tem seus níveis de expressão aumentados, sugerindo que o metabolismo, nesta fase, seja predominantemente anaeróbio (Felipe *et al.*, 2005).

O perfil transcricional de *P. brasiliensis* durante a diferenciação morfológica de micélio para levedura foi avaliado utilizando o isolado *Pb01*. A expressão de 1.107 transcritos obtidos a partir de biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis*, isolado *Pb01*, após 22 horas de indução da transição dimórfica de micélio para levedura foi avaliada. Foram identificados genes com níveis de expressão aumentados relacionados ao remodelamento da parede celular, como os genes codificantes para quitinase 1 (CTS1) e 3 (CTS3) bem como transcritos que codificam para enzimas relacionadas com a síntese e degradação de carboidratos de membrana, entre outros. Os dados sugerem que o remodelamento da parede celular ocorra nos estágios iniciais da transição. Transcritos relacionados ao ciclo do glioxalato, tais como isocitrato liase, malato desidrogenase, citrato sintase e aconitase sugerem que esta via seja funcional durante a transição dimórfica. Além disto, genes relacionados às vias de transdução de sinais (MAPK, serina/treonina quinase e histidina quinase) apresentaram níveis de expressão aumentados, sugerindo o controle destes genes na adaptação e sobrevivência do fungo durante os estágios iniciais da transição (Bastos *et al.*, 2007).

I.4. Parede celular

A parede celular de fungos é uma estrutura dinâmica cuja composição e organização é regulada durante o ciclo celular e em resposta às mudanças nas condições ambientais e ao estresse (revisado por San-Blas *et al.*, 2008). Estudos mostram que o

perfil transcricional de fungos em resposta a estas condições claramente as necessidades de remodelamento da parede celular (Damveld *et al.*, 2005b).

Três tipos de monossacarídeos formam as cadeias de carboidratos presentes na parede celular de fungos: D-glicose (Glc), N-acetyl-D-glicosamina (GlcNAc) e D-manose (Man). Cadeias polissacarídicas compostas por homopolímeros de glicose são genericamente denominados glicanas. De acordo com sua estrutura anomérica podem ser β -glicana ou α -glicana. Ainda, de acordo com o tipo de ligação podem ser 1,3 ou 1,4, polímero linear, e ainda 1,6 originando cadeias ramificadas. Polímeros lineares de β -1,4-GlcNAc são denominados de quitina. Este polímero fornece firmeza e força à estrutura da glicana. Alguns trabalhos sugerem que o polímero de quitina desempenha um importante papel no mecanismo de restauração da integridade celular. Diante de uma diminuição no conteúdo de glicana na parede celular há um aumento compensatório no conteúdo de quitina (Masuoka, 2004; Lagorce *et al.*, 2002).

Para a maioria dos fungos, a estrutura central da parede celular é o polímero ramificado de β -1,3-glicana com ligações β -1,6 ligado à quitina por ligações β -1,4. As ligações glicosídicas β -1,6 entrecadeias perfazem 3% e 4% do total de ligações de glicana em *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus fumigatus*, fungos cuja parede celular tem sido investigada detalhadamente (revisado por Latgé, 2007).

Os polissacarídeos da parede celular de fungos podem ser separados em duas frações dependendo da sua solubilidade em hidróxido de sódio. Em *A. fumigatus* e *Cryptococcus neoformans*, a fração álcali-insolúvel (AI) constitui o esqueleto da parede celular, sendo composta por β -1,3-glicana ligada aos polissacarídeos quitina, β -1,6 e β -1,4 glicana e galactomanana. A fração álcali-solúvel (AS) é um cemento amorfo composto principalmente por α -1,3-glicana, β -1,3-glicana e galactomanana (Beauvais *et al.*, 2005; Reese *et al.*, 2007).

Análises bioquímicas mostraram que a parede celular de *P. brasiliensis* difere dependendo das fases de vida do fungo, levedura e micélio, como mostrado na figura 1. A parede celular da fase leveduriforme tem maior quantidade de quitina em relação à parede celular da fase miceliana. Em adição, a fase miceliana possui maior teor de proteínas totais e de proteínas com pontes dissulfeto (12 vezes mais) que a fase de levedura (Carbonell *et al.*, 1970; Kanetsuna *et al.*, 1972). Em ambas as fases, 40% da parede celular é composta de glicana. Na fase leveduriforme, α -1,3-glicana, presente na fração AS, é o principal polímero da parede celular com pequenas quantidades de ligações α -1,4 e α -1,6 e está presente na fração AS. Além disso, 4 a 5% da parede celular da fase leveduriforme é composta por β -1,3-glicana, presente na fração AI. O polímero de β -glicana da fase miceliana, presente tanto na fração AI quanto na fração AS, contém principalmente ligações β -1,3 e pequenas quantidades de ligações β -1,6. Galactose e manose também são encontradas na parede celular da fase miceliana e em pequenas quantidades (1 a 2%) na parede celular da fase leveduriforme. A fase miceliana apresenta uma única camada composta por quitina, β -glicana e proteínas. Já a fase leveduriforme apresenta uma camada externa formada por α -1,3-glicana e uma camada interna formada por quitina, pequenas quantidades de β -glicana pontuada, proteínas e lipídeos (Kanetsuna *et al.*, 1972).

No transcriptoma de *P. brasiliensis*, nas fases de micélio e levedura, foram identificados genes que codificam para proteínas envolvidas na estrutura, composição e organização da parede celular (Tomazett *et al.*, 2005). Entre as seqüências identificadas destacam-se: β -1,3-glicana sintase (*PbFKS1*), quitina sintase (*PbrCHS1-6*) e glicosiltransferases (*PbGEL1*, *PbGEL2* e *PbGEL3*).

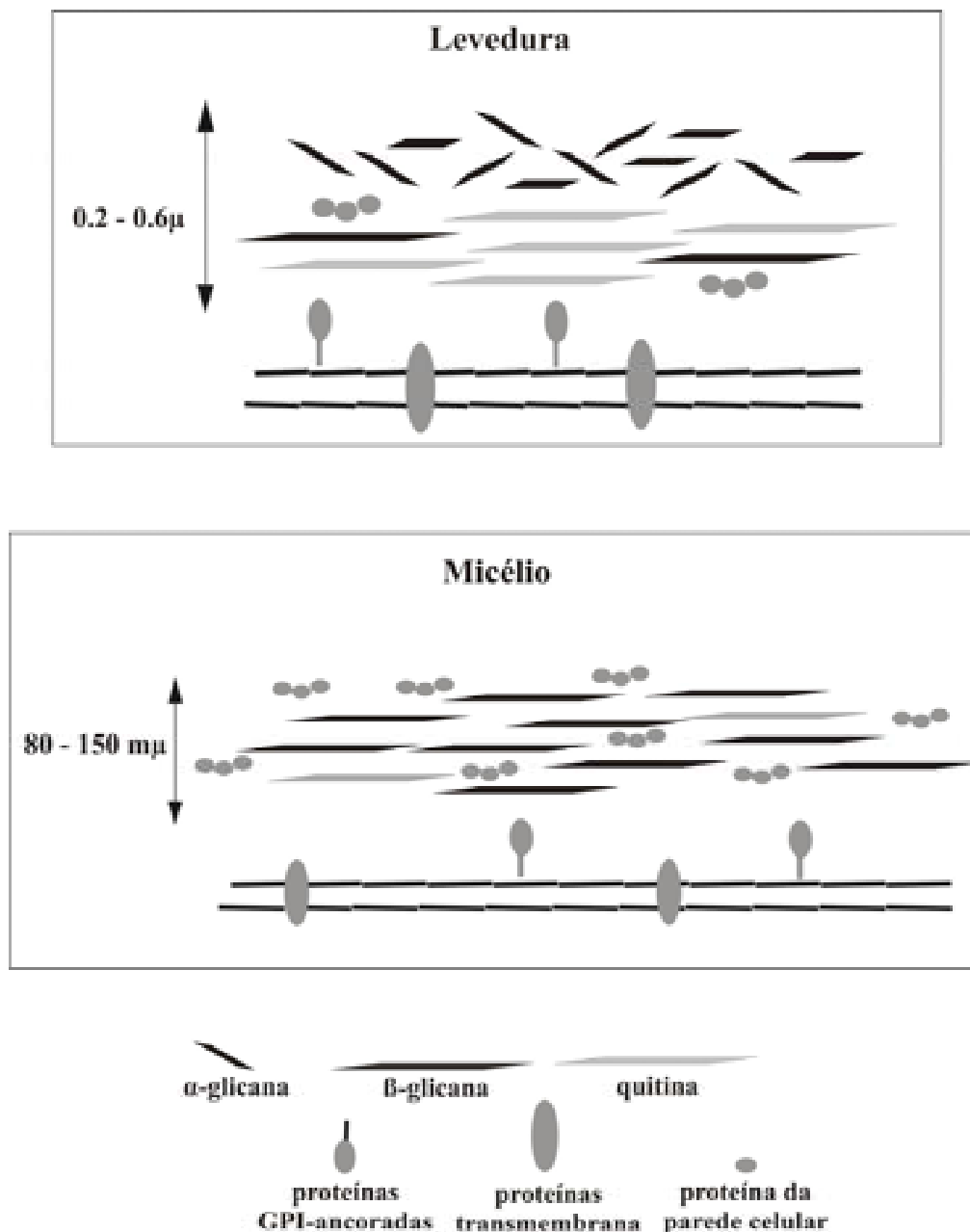


Figura 1-Representação esquemática dos principais componentes da parede celular de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme e na fase miceliana mostrando polímeros de α -glicana, β -glicana e quitina assim como proteínas da parede celular, proteínas transmembrana e proteínas GPI ancoradas (baseado em Kanetsuna *et al.*, 1972).

Os polímeros da parede celular são imunogênicos. Camundongos pré-tratados com quitina tiveram uma maior sobrevivência após infecção com *Candida albicans* (Rementería *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1984). Evidências indicam que macrófagos, células responsáveis pela resposta imune inata, apresentam receptores para manose e para proteínas que se ligam a glicana (Masuoka, 2004). β -glicana é capaz de induzir um aumento da liberação do TNF- α (fator de necrose tumoral-alfa), com consequente morte do fungo (Brown *et al.*, 2003). Ainda, foi proposto que β -glicana de *C. albicans* induz a proliferação de linfócitos e células dendríticas e potencializa a alergia (Inoue *et al.*, 2009).

O sistema imune inato de mamíferos detecta a invasão de microorganismos patogênicos pelo reconhecimento de fragmentos dos patógenos conhecidos por PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern). Receptores presentes nas células do hospedeiro correspondente, denominadas PRRs (Pattern-Recognition Receptors), detectam estes PAMPs que caracterizam uma ampla classe de microorganismos. O polímero de β -glicana (com ligações β -1,3 ou β -1,6) é um tipo de PAMP, sendo que seu receptor, denominado dectina-1, é um receptor de lecitina tipo C expresso na superfície de células dendríticas, macrófagos e neutrófilos (Brown *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2007). Os mecanismos de defesa que requerem a ativação deste tipo de receptor variam de acordo com o organismo. Em *C. neoformans*, devido ao baixo conteúdo de β -glicana, não ocorre ativação da resposta imune inata através do receptor dectina-1 (Nakamura *et al.*, 2007).

Polissacarídeos constituintes da parede celular são exclusivos de fungos e consequentemente, possíveis inibidores das vias de biossíntese desses açúcares não devem ter efeitos secundários tóxicos em humanos, como ocorre para os antifúngicos existentes (Latge *et al.*, 2005). Como vantagem adicional, a síntese e organização dos

componentes da parede celular ocorrem vetorialmente através da membrana plasmática e no espaço periplasmático (Cabib *et al.*, 1998). Dessa forma, inibidores de síntese da parede não precisam necessariamente penetrar na célula para atuar.

Inibidores das enzimas envolvidas no metabolismo da parede celular têm demonstrado causar deformação na morfologia de células fúngicas (Arelano, 1996). Até agora, apenas os inibidores de β -1,3-glicana sintase foi lançado clinicamente (Latge, 2007). A classe mais estudada desses inibidores é a das equinocandinas (composta por caspofungina, micafungina, e anidulafungina) (Barret, 2000) que são moléculas isoladas de fungos e quimicamente modificadas em laboratório. Essas moléculas possuem um hexapeptídeo cíclico central com uma cadeia lateral lipídica, o qual é responsável pela atividade antifúngica (Odds *et al.*, 2003). As equinocandinas inibem a síntese do polímero de β -1,3-glicana de fungos alterando as funções da membrana, ocasionando perda da atividade enzimática de β -1,3-glicana sintase, sem nenhuma ligação direta ao sítio catalítico da enzima, resultando na produção de uma parede celular osmoticamente instável e estruturalmente comprometida (Klepser, 2003). Entretanto, apresentam um limitado espectro de atividade para *P. brasiliensis* (Nakai *et al.*, 2003; Dávila *et al.*, 1986) e outros fungos (Georgopapadakou, 2002).

Em *P. brasiliensis*, o polímero de β -1,3-glicana é apontado como um importante imunomodulador enquanto que o de α -1,3-glicana está comumente relacionado à virulência (Restrepo-Moreno, 1993; Silva *et al.*, 1997). A mudança na composição da parede celular durante a infecção, como a que ocorre em *P. brasiliensis*, pode ser considerada um mecanismo de escape da resposta imune inata, que é essencial para o controle de infecções fúngicas (Borges-Walmsley *et al.*, 2002). Dessa forma, α -1,3-glicana localizada mais externamente na parede celular deve atuar como um protetor de

β -1,3-glicana contra os mecanismos de defesa do hospedeiro (Silva *et al.*, 1994; San-Blas and San-Blas, 1982).

I.5. Proteínas envolvidas na biossíntese da parede celular

I.5.1. β -1,3-glicana sintase

A síntese do polímero β -1,3-glicana, principal componente da parede celular de fungos filamentosos e de leveduras, é realizada por um complexo enzimático constituído de subunidade catalítica e regulatória. A enzima β -1,3-glicana sintase (Fks) (UDP-glicose: 1,3- β -D-glicana 3- β -D-glicanosyltransferase; EC 2.4.1.34) catalisa a adição de glicana ao polímero de β -1,3-glicana. Fks é regulada por membros da família das Rho-GTPases (Arelano *et al.*, 1996; Roh *et al.*, 2002; Guest *et al.*, 2004).

As proteínas Rho (Ras homology) GTPases são membros da superfamília Ras, também conhecidas por pequenas GTPases. Em sua forma inativa apresenta-se ligada ao GDP e a forma ativada é ligada ao GTP. Fatores GEF (GDP-GTP exchange factor) catalisam esta troca atuando como ativadores da GTPase. As proteínas Rho, além de atuarem com unidade regulatória do complexo de β -1,3-glicana sintase exercem diversas funções na célula como participação da cascata de polarização da célula, polimerização de actina e ativação de componentes da via de sinalização de estresse da parede celular, fazendo uma conexão entre crescimento polarizado e biossíntese da parede celular (Douglas, 2001; Guest *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2006).

É sugerido que Fks esteja ancorada na membrana celular e que Rho esteja localizada mais externamente à membrana, voltada para o citoplasma (San-Blas, 1979; Inoue *et al.*, 1995; Kelly *et al.*, 1996). β -1,3-glicana sintase utiliza UDP-glicose como

substrato. De acordo com (Lesage and Bussey, 2006), em *S. cerevisiae*, o complexo enzimático de β -1,3-glicana sintase catalisa a síntese e o deslocamento das cadeias de glicana geradas para dentro do espaço periplasmático. Após sua síntese, as cadeias de β -1,3-glicanas são ramificadas, alongadas e remodeladas a fim de criar uma estrutura robusta capaz de neutralizar a pressão osmótica interna e determinar a morfologia celular (Lesage and Bussey, 2006).

O gene β -1,3-glicana sintase (FKS) é essencial e apresenta cópia única para microorganismos como *C. neoformans*, *A. fumigatus*, *Coccidioides posadasii* (Thompson *et al.*, 1999; Beauvais *et al.*, 2001; Kellner *et al.*, 2005) tornando difícil o estudo da função de FKS nestes microorganismos, pois após a deleção de um gene essencial, os mutantes tornam-se muito instáveis.

Schizosaccharomyces pombe apresenta quatro genes homólogos de β -1,3-glicana sintase, *bgs1*, *bgs2*, *bgs3* e *bgs4*. A função dos genes *bgs1*, *bgs3* e *bgs4* é semelhante e está relacionada com o processo de síntese do septo da parede celular que é responsável pela divisão celular. As proteínas Bgs1p, Bgs2p e Bgs3p estão localizadas em pólos de crescimento celular, juntamente com anel contrátil de actomiosina no septo da divisão celular e em sítios de síntese da parede celular (Cortes *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002; Cortes *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2003; Cortes *et al.*, 2007). O gene *bgs2* não é expresso durante o crescimento vegetativo, mas é essencial para a formação da parede do esporo. Bgs2p localiza-se na periferia do ascósporo e é requerido para maturação apropriada da parede do esporo (Martin *et al.*, 2000).

S. cerevisiae apresenta três genes homólogos β -1,3-glicana sintase. Fks1p e Fks2p são duas subunidades catalíticas de β -1,3-glicana sintase e suas sequências são conservadas. Deleções dos genes *FKS1* ou *FKS2* produzem células viáveis, mas a dupla deleção é letal (Mazur *et al.*, 1995). *FKS1* é expressa em condições de crescimento

ótimas; *FKS2* tem sua expressão induzida em resposta ao tratamento com ferormônios, cloreto de cálcio, durante o crescimento do fungo na presença de fontes pobres em carbono, como galactose, acetato ou glicerol, ou através da via de integridade celular (Zhao *et al.*, 1998). Apesar do papel de *FKS3* não ter sido completamente elucidado, mutantes para este gene não apresentam defeitos celulares aparentes durante o crescimento vegetativo. No entanto, *FKS3*, juntamente com *FKS2*, são enzimas chave para a síntese da parede celular de esporos, estruturas de resistência a danos ambientais, em *S. cerevisiae*, sendo que *FKS3* possui uma atuação regulatória neste processo (Iwamoto *et al.*, 2005; Ishihara *et al.*, 2007).

SPS1, um gene expresso especificamente durante a esporulação, é responsável pelo transporte de *FKS2* para a membrana do esporo. Mutantes para *SPS1* apresentam *FKS2* em estruturas intracelulares (Iwamoto *et al.*, 2005). Durante o crescimento vegetativo, as proteínas Fks1p e Fks2p parecem se localizar em regiões de crescimento polarizado (Dijkgraaf *et al.*, 2002), assim como AfFks1p de *A. fumigatus* (Beauvais *et al.*, 2001). Estudos em *S. cerevisiae* mostraram que Fks1p se co-localiza com fragmentos de actina e se movimenta em regiões de crescimento ativo da parede celular, nos estágios iniciais de crescimento do broto e também durante a citocinese sugerindo que fragmentos de actina são sítios de remodelamento da parede celular (Utsugi *et al.*, 2002).

Um total de 20% do conteúdo total de glicana da parede celular de *S. cerevisiae*, é relativo à β -1,6-glicana. Sugere-se que este polímero possui uma função de interconectar os componentes da parede celular com β -1,3-glicana, quitina e manose (Cabib *et al.*, 2001). O mecanismo de biossíntese de β -1,6-glicana ainda é obscuro. No entanto, alguns genes parecem estar envolvidos neste processo, como *KRE5*, que codifica uma proteína similar à glicoproteína UDP-glicose: glicosiltransferase do

retículo endoplasmático, e *KRE6* e *SKN1*, que codificam um par de proteínas homólogas similares às proteínas da família 16 de hidrolases glicosídicas do complexo de Golgi. Estes genes foram identificados através de mutações que conferiram resistência à toxina letal K1, uma proteína formadora de poros que se liga a receptores da superfície celular que contém β -1,6-glicana. Estudos sugerem que Fks1p e Fks2p podem estar implicadas também na biossíntese de β -1,6-glicana de forma indireta (Dijkgraaf *et al.*, 2002).

O processo de biossíntese de β -1,3-glicana e os mecanismos utilizados para sua incorporação na parede celular foram estudados em *S. cerevisiae*. Estes estudos mostraram que tanto a subunidade regulatória Rho1p quanto as subunidades catalíticas Fks1p e Fks2p devem ser transportadas para a membrana plasmática, nas formas inativas, através de uma via secretória após sua síntese no retículo endoplasmático (Abe *et al.*, 2003). De acordo com (Abe *et al.*, 2003), no retículo endoplasmático há um precursor da biossíntese de esfingolípídeos, denominado fitoesfingosina (PHS). Este composto é um potente inibidor da atividade de glicana sintase *in vivo*. Desta forma, sugere-se que PHS possa inibir a atividade de glicana sintase no retículo endoplasmático. Muitas proteínas que se localizam na membrana plasmática são sintetizadas em organelas intracelulares e transportadas através de uma determinada via secretória para a membrana plasmática. Estudos mostraram o acúmulo de Fks1p, Fks2p e Rho1p em organelas intracelulares de mutantes com o transporte vesicular bloqueado (Abe *et al.*, 2003). Estes dados sugerem que possivelmente Fks1p e Fks2p sejam transportadas do retículo endoplasmático para a membrana plasmática de forma inativa devido ao PHS (Abe *et al.*, 2001).

Em *P. brasiliensis* um único gene de β -1,3-glicana sintase (*PbFKS1*) foi isolado (Pereira *et al.*, 2000). A presença de apenas um gene para β -1,3-glicana sintase em *P. brasiliensis* foi confirmada com o sequenciamento do genoma estrutural dos isolados

Pb01, *Pb03* e *Pb18* deste fungo. *PbFKS1* apresenta 5781 nucleotídeos e codifica para uma proteína predita de 1926 aminoácidos com uma massa predita de 212 kDa e ponto isoelétrico de 8,5. Os vários motivos regulatórios encontrados na região promotora refletem a provável complexidade dos mecanismos envolvidos na sua expressão (Pereira *et al.*, 2000).

A análise do perfil hidropático prediz uma proteína integral de membrana com 16 hélices transmembrana (HTM), sendo a porção N-terminal, constituída de 6 HTM e a porção C-terminal, de 10 HTM. A *PbFks1p* apresenta um domínio catalítico predito de 588 aminoácidos, altamente hidrofílico; as regiões N- e C- terminais também são hidrofílicas. *PbFks1p* apresenta 71% e 64% de similaridade com *Fks1p* e *Fks2p* de *S. cerevisiae* e 80% de identidade e 85% de similaridade com *FksAp* de *Aspergillus nidulans*. Quando se compara apenas a região relativa ao domínio catalítico, a identidade entre *PbFks1p* e *FksAp* é aumentada para 95% (Pereira *et al.*, 2000).

Em *P. brasiliensis*, a síntese de β -1,3-glicana foi identificada através da incorporação de glicose radioativa, a partir de UDP-glicose (substrato específico para β -1,3-glicana sintase, de acordo com Cabib *et al.*, 1987) marcada radioativamente, tanto da fase miceliana quanto da fase leveduriforme (San-Blas, 1979). Esta atividade foi detectada principalmente na fração membrana da célula (preparação particulada) (San-Blas, 1979).

Análises transcricionais de *P. brasiliensis* (Felipe *et al.*, 2003; Felipe *et al.*, 2005) permitiram a identificação, *in silico*, do nível de transcritos de *PbFKS1* em ambas as fases do fungo. De acordo com estas análises, *PbFKS1* foi mais expresso na fase leveduriforme do que na fase miceliana. Além disso, análises de *Northern blot* corroboraram com este dado mostrando uma maior expressão de *PbFKS1* na fase leveduriforme (Sorais *et al.*, 2009). Entretanto, análises bioquímicas da parede celular

de *P. brasiliensis* indicaram que o polímero de β -1,3-glicana está presente em maior quantidade na fase miceliana do fungo. Este fato sugere que *PbFKS1* seja regulado pós-transcricionalmente e/ou pós-traducionalmente.

I.5.2. Biosíntese de quitina

A síntese de quitina em fungos é um processo complexo regulado por famílias multigênicas que codificam isoenzimas de quitina sintase, as quais podem ser redundantes e cujas funções podem ser distintas dentro da célula (Henar Valdivieso *et al.*, 1999). Baseado em diferenças de regiões conservadas nas sequências gênicas, as quitina sintases foram classificadas em seis classes (Munro and Gow, 2001).

Cinco genes codificantes para quitina sintase (*PbrCHS1*, *PbrCHS2*, *PbrCHS4*, *PbrCHS5* e *PbrCHS6*) foram detectados em ambas as fases de micélio e levedura de *P. brasiliensis* (Nino-Vega *et al.*, 1998; Nino-Vega *et al.*, 2000; Nino-Vega *et al.*, 2004; Tomazett *et al.*, 2005; San-Blas and Nino-Vega, 2008). *PbrCHS3* foi identificado e estudos mostraram que é expresso exclusivamente na fase leveduriforme (Barreto *et al.*, 2009).

O polímero de quitina é um polissacarídeo linear composto de resíduos de N-acetilglicosamina (GlcNac) unidos por ligações β -1,4-. UDP-GlcNac é o substrato utilizado pela enzima quitina sintase durante a síntese de quitina. A via de biossíntese de UDP-GlcNac a partir de glicose ocorre no citoplasma (figura 2). Frutose-6-fosfato é convertido a GlcN-6-fosfato (GlcN-6-P) pela GlcN-6-P synthase (codificada pelo gene *GFA1*), o qual é então acetilado pela GlcN-6-P acetiltransferase (codificada pelo gene *GNA1*) originando GlcNac-6-P. Este composto é convertido a GlcNac-1-P pela acetilglicosamina fosfomutase, codificada pelo gene *AGM1*. A síntese de UDP-GlcNac

a partir de GlcNac-1-P e UTP é catalizada pela UDP-GlcNac pirofosforilase (codificada pelo gene *UAP1*) (Watzel and Tanner, 1989; Bulik *et al.*, 2003).

Os quatro genes codificantes para enzimas que atuam na via de biossíntese de UDP-GlcNac (*GFA1*, *GNA1*, *AGM1* e *UAP1*) são induzidos durante a meiose, esporulação e durante a síntese de quitina a ser depositada na parede do esporo em *S. cerevisiae* (Bulik *et al.*, 2003; Lagorce *et al.*, 2002) *Gfa1p* é a primeira enzima desta via, sendo um fator limitante para a síntese do polímero de quitina (Lagorce *et al.*, 2002)

Em *S. cerevisiae*, a proteína *Chs3p* é responsável pela síntese de aproximadamente 90% do polímero de quitina na fase vegetativa da célula. Foi observado que diante de uma elevada expressão do gene *CHS3* houve um aumento no conteúdo de quitina. Diante de uma expressão cinco vezes maior de glicosamina-6-P sintase, *Gfa1p*, o conteúdo de quitina aumentou três vezes (Lagorce *et al.*, 2002), sugerindo que *Gfa1p* atua fortemente no controle da síntese de quitina.

Estudos realizados em *C. albicans* mostraram que *GFA1* é uma enzima homotetramérica e sua atividade é regulada em resposta à UDP-GlcNac através de inibição por retroação, assim como por fosforilação/desfosforilação mediada pela proteína quinase A (PKA) e outras fosfatases (Olchoway *et al.*, 2007).

A síntese de quitina parece ser essencial na resposta compensatória ao estresse da parede celular. Danos na parede celular causados por mutações em genes relacionados à síntese da parede celular ou induzidos por agentes estressores, como CFW e zimoliase, resultam em um acúmulo de quitina (Ram *et al.*, 1994; Lagorce *et al.*, 2002; Kapteyn *et al.*, 1997) e em uma expressão aumentada de *GFA1* em *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *A. niger* (Terashima *et al.*, 2000; Lagorce *et al.*, 2002; Ram *et al.*, 2004). Desta forma, sugere-se que mecanismos compensatórios semelhantes ocorrem tanto em leveduras quanto em fungos filamentosos.

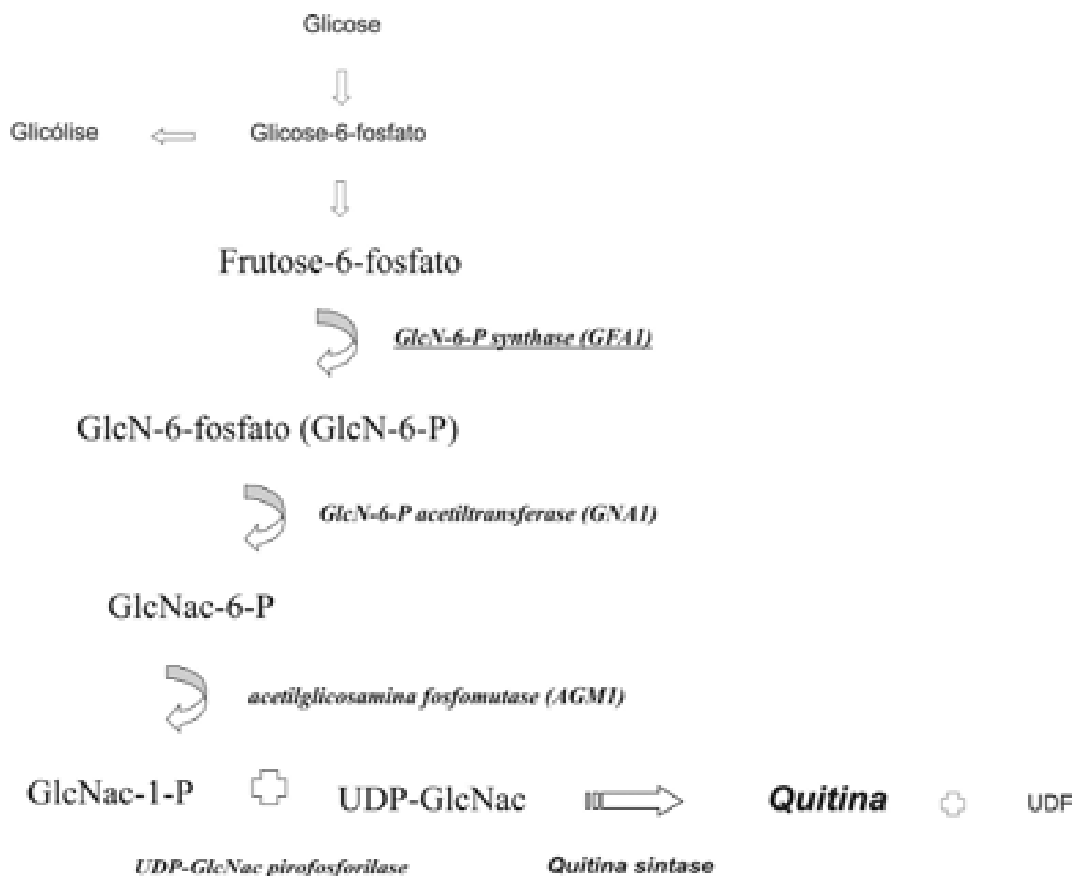


Figura 2. Esquema representativo da via de biossíntese do polímero de quitina (adaptado de Lagorce *et al.*, 2002)

Uma única cópia do gene *GFA1* foi encontrada nos genomas dos isolados *Pb01*, *Pb03* e *Pb18* de *P. brasiliensis*. De acordo com análises transcricionais, *PbGFA1* é expresso em ambas as fases de vida do fungo, bem como durante o processo de infecção (Costa *et al.*, 2007).

I.5.3. β -1,3-glicanosiltransferase 3

As glicosil hidrolases e as glicosiltransferases/transglicosilases possuem um papel crucial durante o remodelamento da parede celular (revisado por Latgé, 2007). Glicosil hidrolases degradam polímeros de glicana principalmente para regular a plasticidade da parede celular durante divisão celular e esporulação, enquanto as transglicosilases são capazes de formar novas ligações entre oligossacarídeos gerando polímeros mais longos ou ramificados. Várias proteínas ancoradas à membrana plasmática por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) apresentam atividade de transglicosilases (Mouyna *et al.*, 2000; Rodriguez-Pena *et al.*, 2000). Dentre elas estão Gas (em *S. cerevisiae*), Gel (em *A. fumigatus*) e Phr (em *C. albicans*) (Ragni *et al.*, 2007; Mouyna *et al.*, 2000; Muhlschlegel and Fonzi, 1997).

As enzimas Gas1p, Gel1p, Phr1p e Phr2p catalisam *in vitro* dois passos da reação de β -1,3-glicanosiltransferase. Inicialmente, uma ligação glicosídica interna de uma cadeia de β -1,3-glicana doadora é clivada e a porção redutora é liberada. Em seguida, esta porção é transferida para uma extremidade não redutora de uma cadeia de β -1,3-glicana receptora, resultando no seu alongamento. Desta forma, foi proposto que estas proteínas poderiam agir *in vivo* como um grupo de enzimas que transferem segmentos de β -1,3-glicana em pontos ramificados de outras glicanas, criando assim múltiplos sítios de ancoragem para manoproteínas, quitina ou para galactomananas (Mouyna *et al.*, 2000).

Mutação no gene *GAS1* acarreta defeitos morfogênicos na maturação do broto e na separação celular, causando assim um aspecto agrupado na fase estacionária de *S. cerevisiae*. As células se tornam mais sensíveis na presença de SDS ou CFW e mais resistentes às enzimas hidrolíticas (Ram *et al.*, 1994; Popolo *et al.*, 1997). De fato, os mutantes *gas1* Δ além de exibirem um crescimento reduzido apresentam também alterações estruturais na parede celular, incluindo uma diminuição do conteúdo de

glicana e aumento no conteúdo de quitina (Popolo *et al.*, 1997). Desta forma sugere-se que enzimas Gel/Gas atuam na manutenção da integridade da parede celular.

No genoma dos isolados *Pb01*, *Pb03* e *Pb18* foi identificado um gene codificante para β -1,3-glicosiltransferase 3, *PbGEL3*. Análises por PCR em tempo real (qRT-PCR) mostraram que *PbGEL3* é mais expresso na fase de micélio e durante a transição para a fase leveduriforme (Castro *et al.*, 2009). A proteína, *PbGel3p* foi capaz de restaurar os defeitos estruturais causados na parede celular de mutantes para *Gas1* de *S. cerevisiae* mostrando o importante papel de *PbGEL3* nos mecanismos compensatórios induzidos em resposta a danos na parede celular (Castro *et al.*, 2009).

I.6. Integridade da parede celular

Para a sobrevivência da célula é necessário que esta mantenha a integridade da parede celular principalmente em estágios que envolvam extenso remodelamento da parede, como brotamento e divisão celular e também em situações de estresse como extremos de temperatura e pH (Cabib *et al.*, 2001). Em fungos foi identificada uma cascata de transdução de sinal composta por proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPK) denominada via de sinalização da integridade da parede celular (IPC) (Levin, 2005). Compostos como CFW, SDS, cafeína, vanadato e zimoliase são compostos conhecidos por induzir o estresse na parede celular e consequentemente, a via de sinalização de IPC. Sorbitol e os sais KCl e NaCl, que aumentam a osmolaridade do meio são comumente utilizados para estudar a resposta diante de estresse osmótico que também é responsável pela ativação de mecanismos que induzem a restauração da integridade da parede celular (Hohmann, 2002). Mutantes para genes relacionados à biossíntese e manutenção da parede celular geralmente são hipersensíveis a estes

compostos (Damveld *et al.*, 2005a; Damveld *et al.*, 2005b; Kuranda *et al.*, 2006; Madrid *et al.*, 2007).

De uma forma geral, após o tratamento de fungos com estes agentes há um aumento na transcrição de genes relacionados com a composição da parede celular como glicana sintases (de Nobel *et al.*, 2000; Damveld *et al.*, 2005b) e quitina sintases (Damveld *et al.*, 2005a) assim como genes pertencentes à via IPC, como as MAPK Slt2/Mpk1 e Hog1, entre outros (Bermejo *et al.*, 2008; Madrid *et al.*, 2007; Navarro-Garcia *et al.*, 2005). Além disso, um aumento no conteúdo de polímeros da parede celular como glicanas e quitinas é observado diante destes tratamentos como mecanismos compensatórios (Kuranda *et al.*, 2006; Ram *et al.*, 2004).

O fungo recebe sinais de condições de estresse através de uma série de sensores ligados à membrana plasmática. A figura 3 mostra um esquema de alguns mecanismos compensatórios sugeridos em fungos diante da ativação por danos na parede celular. Estes sinais são transmitidos à proteína Rho1p que age como ativador da proteína quinase C, Pkc1p, a qual controla uma cascata de MAPK que inclui as proteínas Bck1p, Mkk1p, Mkk2p, Mpk1p e Slt2p de *S. cerevisiae* (Sekiya-Kawasaki *et al.*, 2002). Esta cascata é requerida para a IPC sendo que defeitos em Pkc1p e em algum membro da cascata leva à lise da célula. Uma das funções desta via MAPK é regular positivamente a transcrição de vários genes envolvidos na biossíntese da parede celular, incluindo *FKS2* (Zhao *et al.*, 1998). A ativação de proteínas como Chs, Gfa, Gel e Ags, α -1,3-glicana sintase, também é observada como mecanismos compensatórios.

Em *S. cerevisiae* a via de IPC é ativada através de altas temperaturas, compostos que causam danos na parede celular e estresse oxidativo, pela proteína Pkc1p. A regulação desta é feita pela fosforilação da proteína quinase Slt2/Mpk1 (Jung *et al.*, 2002; Levin, 2005). Existem dois fatores de transcrição que são ativados por esta via: o

fator de transcrição SBP, composto por Swi4p e Swi6p, e o fator de transcrição “MADS-box” Rlm1p (Lagorce *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2004).

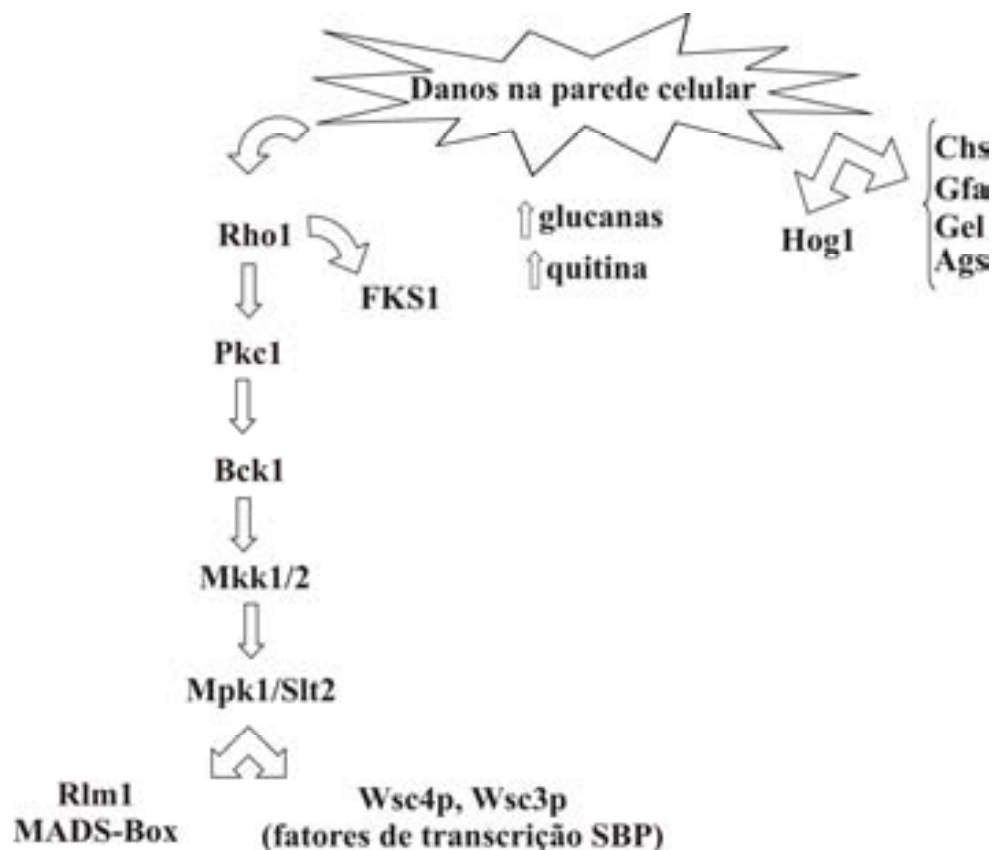


Figura 3. Esquema de mecanismos compensatórios de fungos diante de danos na parede celular.

Em *Aspergillus niger* foram identificados prováveis sítios de ligação de RlmA, homólogo de Rlm1p, nas sequências das regiões promotoras dos genes *gfaA*, codificante para glicosamina-6-fosfato sintase e *agsA*, codificante para α -1,3-glicana sintase. Ainda, foi observado que a indução de *agsA* e, de forma parcial, também a indução de *gfaA* foram dependentes de Rlm1p diante de condições de estresse causado por CFW

(Damveld *et al.*, 2005a). A expressão de *agsA* em *A. niger* também foi induzida na presença de SDS (Damveld *et al.*, 2005b). Foi observado na presença de CFW e zimoliase, um aumento na expressão de *FKS2*, subunidade catalítica de β -1,3-glicana sintase em *S. cerevisiae* (de Nobel *et al.*, 2000); um aumento na deposição de quitina na parede celular, também em *A. niger* na presença de CFW (Ram *et al.*, 2004).

A via de IPC também foi identificada em *S. pombe*. Os homólogos *PMK1/SPM1* são induzidos em condições de temperatura elevada, danos na parede celular, estresse oxidativo e hiperosmolaridade (Madrid *et al.*, 2007).

Análises *in silico* em *P. brasiliensis* revelaram algumas proteínas homólogas da via de IPC tais como Rho1p, Pkc1p, Bck1p (também denominada Slk1p), a MAPK Slt2p (também denominada Mpk1p), bem como os fatores de transcrição Rlm1p e o complexo SBF composto por Swi4p e Swi6p (Fernandes *et al.*, 2005; Felipe *et al.*, 2005). No entanto, o comportamento de *P. brasiliensis* diante de condições de estresse na parede celular, assim como os mecanismos compensatórios utilizados por este organismo nesta situação são pouco conhecidos.

II. Justificativas

A parede celular de fungos é uma estrutura essencial devido à força mecânica e habilidade em resistir à pressão interna e consequentemente resistir à lise celular. No intuito de sobreviver ao estresse ocasionado pelo meio ambiente, os fungos são capazes de alterar a composição e/ou estrutura da parede celular por mecanismos compensatórios. Esta resposta a danos ambientais tem sido elucidada em detalhes em fungos como *S. cerevisiae* (Garcia *et al.*, 2004; Levin, 2005), *A. nidulans* (Fujioka *et al.*, 2007), *C. albicans* (Plaine *et al.*, 2008), *S. pombe* (Madrid *et al.*, 2006), entre outros.

No fungo termo-dimórfico *P. brasiliensis*, os principais componentes da parede celular são quitinas e glicanas. Estes polímeros fazem uma barreira primária responsável pela integridade estrutural e pela forma da parede celular. Nosso grupo tem estudado genes e proteínas relacionados à síntese e organização da parede celular, pois além de estarem envolvidas na manutenção da integridade do fungo diante de agentes estressores do meio ambiente são moléculas ausentes em células humanas, o que as torna possíveis alvos para o desenvolvimento de agentes antifúngicos.

III. Objetivos

Objetivo geral

Os principais objetivos do presente trabalho foram o estudo do comportamento de *P. brasiliensis* diante de situações de estresse e o estudo da expressão e localização de Fks1p de *P. brasiliensis*.

Objetivos específicos

- Analisar a sensibilidade de células leveduriformes de *P. brasiliensis* aos agentes estressores CFW, CR, SDS, NaCl, KCl e sorbitol;
- Analisar a expressão de *PbFKS1*, *PbGFA1* e *PbGEL3* após o crescimento de *P. brasiliensis* em condições de estresse;
- Dosar o conteúdo de carboidratos totais, β -1,3-glucana, e de resíduos de GlcNAc na parede celular de *P. brasiliensis* após crescimento em condições de estresse;
- Analisar, por microscopia confocal, a morfologia da parede celular de *P. brasiliensis* após crescimento em condições de estresse;
- Analisar a expressão de *PbFKS1* nas fases de levedura e micélio de *P. brasiliensis*;
- Obter a proteína recombinante referente à região catalítica de *PbFks1p* (*PbFks1pc*);
- Avaliar a atividade enzimática das proteínas *PbFks1p* e *PbFks1pc*;
- Obter anticorpos policlonais específicos para *PbFks1pc*;
- Determinar a citolocalização de *PbFks1p* em *P. brasiliensis*.

Capítulo II

Manuscrito

**Response of *Paracoccidioides brasiliensis* to stressor agents
and cell wall osmoregulators**

Response of *Paracoccidioides brasiliensis* to stressor agents and cell wall osmoregulators

Patrícia Kott Tomazett^a, Nadya da Silva Castro^a, Henrique Leonel Lenzi^b, Célia Maria de Almeida Soares^a, Maristela Pereira^{a*}

^aLaboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, C.P. 131, 74001-970, Goiânia, GO, Brazil. ^bLaboratório de Patologia, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*Corresponding author

Maristela Pereira

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Campus II, Universidade Federal de Goiás, C.P. 131, 74001-970 Goiânia, GO, Brazil.

E-mail address: mani@icb.ufg.br

Tel./fax: +55 62 35211110

Abstract

In its attempt to survive, the cell wall of fungi can change its composition and/or structure in response to environmental stress. The molecules involved in these compensatory mechanisms are a possible target for the development of effective antifungal agents. In the thermo dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, the main polymers that compound the cell wall are chitin and glucans. These polymers form a primary barrier that is responsible for the structural integrity and formation of the cell wall. In this study the behavior of *P. brasiliensis* was evaluated under incubation with cell wall stressor agents such as calcofluor white (CFW), congo red (CR), sodium dodecyl sulfate (SDS), NaCl, KCl and sorbitol. Use of concentrations at which the fungus is visually sensitive to those agents helped to explain some of the adaptive mechanisms used by *P. brasiliensis* in response to cell wall stress. Our results shows that β -1,3-glucan synthase (*PbFKS1*), glucosamine-6-phosphate synthase (*PbGFA1*) and β -1,3-glucanosyltransferase (*PbGEL3*) as well as β -1,3-glucan and *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) residues in the cell wall are involved in compensatory mechanisms against cell wall damage.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*; cell wall integrity; stress conditions; β -1,3-glucan synthase; Glucosamine-6-phosphate synthase; glucanosyltransferase.

Introduction

External challenges that cause cell wall stress lead to the activation of several compensatory mechanisms necessary to restore cell wall integrity. The cell wall of fungi is a dynamic structure whose organization and composition are regulated during the cell cycle and in response to changes in the environment and stress conditions (Klis et al., 2002). The cell wall composition of the thermodimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* varies biochemically depending on its life phase. The cell wall of the yeast phase, found in infected tissue and *in vitro* culture at 36°C (Restrepo, 1985; San-Blas, 1993), has more chitin polymer and less β -1,3-glucan polymer than are found in the saprophytic mycelium phase. The α -1,3-glucan polymer was found only in the yeast phase. Moreover there is a smaller amount of total proteins with disulfide bonds in the mycelium phase (Carbonell et al., 1970; Kanetsuna et al., 1972).

Both proper synthesis and crosslinking of cell wall components are essential in forming a sturdy cell wall which maintain its integrity in response to both internal signals and external conditions (Klis et al., 2006; Lesage and Bussey, 2006). In *P. brasiliensis* there is no efficient method of direct genetic analysis. Thus, an *in silico* search was performed in the *P. brasiliensis* transcriptome-expressed sequence tag database for components of signaling pathways previously known to be involved in cell wall integrity in other species of fungi, including *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans* and particularly *Saccharomyces cerevisiae* (Fernandes et al., 2005). This study makes it possible to evaluate the presence of cellular signaling pathway elements in *P. brasiliensis* and to compare them with the cascade components in these fungi since the response to environmental damage in these species has been

explained in detail (Bermejo et al., 2008; Fujioka et al., 2007; Kojima et al., 2006; Plaine et al., 2008).

Cell wall disruptive and osmotic destabilizing agents lead to cell wall rearrangements that enable fungus cells to survive. It has been suggested that these changes are part of a set of compensatory reactions to ensure cell wall integrity. Calcofluor white (CFW) and congo red (CR) are two related anionic dyes which act by binding to nascent chitin chains, thereby inhibiting the assembly enzymes that connect chitin to glucans (Ram and Klis, 2006). CR reacts with β -glucan and stains through chemical linkage and physical absorption (Slifkin and Cumbie, 1988). Sodium dodecyl sulphate (SDS) is a detergent and protein destabilizer. These agents can destabilize cell walls (Damveld et al., 2005b; de Nobel et al., 2000). KCl and NaCl are ionic compounds or salts that also increase osmotic pressure, causing osmotic stress. Sorbitol is a sugar alcohol that also increases osmotic pressure and can be used as an osmotic stabilizer in stress conditions (Madrid et al., 2007; Thomé, 2007). Fungi growing under cell wall stress conditions engender cell wall remodeling, which causes changes in the cell wall content. This behavior is due to compensatory mechanisms for fungus survival when there is damage to the cell wall (Lesage and Bussey, 2006; Levin, 2005).

In general, under treatment with such compounds, there is an up regulation of genes related to cell wall composition such as glucan synthases (Damveld et al., 2005b; de Nobel et al., 2000;) and chitin synthases (Damveld et al., 2005a) as well as genes belonging to the cell wall integrity (CWI) pathway and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) Slt2/Mpk1 and Hog1, among other genes (Bermejo et al., 2008; Madrid et al., 2007; Navarro-Garcia et al., 2005). Also, an increase in the content of cell wall polymers such as glucans and chitin as a compensatory mechanism was observed under these treatments (Kuranda et al., 2006; Ram et al., 2004).

In the *P. brasiliensis* genome, several cell wall synthesis-related genes were identified. Among them are *PbFKS1*, a presumable β -1,3-glucan synthase coding gene (Pereira et al., 2000); *PbGFA1*, a homologue to glucosamine-6-phosphate synthase, an enzyme that catalyzes the first step of the biosynthetic pathway of chitin, and *PbGEL3*, a presumable β -1,3-glucanotransferase that was able to partially complement the mutant phenotype of *gas1* Δ in *S. cerevisiae* (Castro et al., 2009).

In this study, the behavior of *P. brasiliensis* yeast cells under cell wall stress and hyperosmosis was evaluated. The *P. brasiliensis* cells demonstrated reduced growth under these conditions. Furthermore, to understand this fungus' compensatory mechanisms, the transcript levels of *PbFKS1*, *PbGFA1* and *PbGEL3*, genes essential to cell wall synthesis, the content of β -1,3-glucan and *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) residues, and chitin monomers, were evaluated after treatment with the CFW, CR, SDS, KCl, NaCl and sorbitol stressor agents.

Methods

P. brasiliensis isolate

P. brasiliensis Pb01 isolate (ATCC MYA-826) has been studied in our laboratory (da Silva Neto et al., 2009; Zambuzzi-Carvalho et al., 2009). It was cultivated in semisolid Fava-Netto's medium (1.0% 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, 4% w/v glucose and 1.4% w/v agar, pH 7.2) at 36°C for growth of the yeast phase.

Analysis of cell wall stress sensitivity

According to Ram and Klis, (2006) the preferred way to determine the susceptibility of stressor agents is to inoculate a series of yeast concentrations in the form of spots on plates containing the stressor. For the stress sensitivity analysis, 7-day old *Pb01* yeast cells were grown in liquid Fava-Netto's medium overnight at 37°C. Samples containing 10^6 , 10^5 , and 10^4 cells were spotted onto plates with Fava-Netto's medium supplemented with different stressor agents at different concentrations as follows: CFW (27 mM and 109 mM) CR (35 mM and 143 mM), SDS (0.002% and 0.004%), KCl (0.1 M and 0.2 M), NaCl (1 M and 2 M) and sorbitol (1 M and 2 M). Control plates did not contain any stressors. The plates were incubated for 7 days at 37°C before being photographed.

For transcriptional analysis after growth for 16 h, 10^6 cells were incubated with different stressor agents at the sub-inhibitory concentration, which interferes with fungus growth, but does not inhibit it completely, or with the same amount of water as a control for 1 h before RNA extraction.

Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Total RNA of *Pb01* yeast cells treated and untreated with CFW, CR, SDS, KCl, NaCl and sorbitol (Sigma, St. Louis, MO, USA) stressor agents was extracted using Trizol (Invitrogen, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The quality of RNA was assessed using the A260nm/A280 nm ratio, and by visualization of rRNA using 1.2% (w/v) agarose gel electrophoresis. This protocol has been used in our lab, and is sufficient to disrupt the cell wall and release RNAs (Castro et al. 2009; Zambuzzi-Carvalho et al., 2009). The RNAs were used to construct single-stranded cDNAs using a reverse transcription system (Promega, WI, USA) following the recommendations of the manufacturer. The RNAs were previously treated with DNase

to eliminate genomic DNA and the same reactions were performed in the presence or absence of reverse transcriptase as a control for genomic contamination. qRT-PCR reactions were conducted in an IQ5 real-time PCR detection system. The PCR thermal cycling conditions were as follows: an initial step at 50°C for 2 min, followed by 5 min at 95°C, and 40 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 10 s and 72°C for 15 s. Platinum SYBR Green qPCR Supermix (Invitrogen) was used as the reaction mixture, with addition of 10 pmol of each primer and 1 μ L of template cDNA for a final volume of 25 μ L. Each cDNA sample was analyzed in triplicate with each primer pair. A melting curve analysis was performed at the end of the reaction to confirm a single PCR product. The data were normalized with ribosomal protein L34 in each set of qRT-PCR experiments (Bastos et al., 2007; Castro et al., 2009). The relative expression data were obtained using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). A nontemplate control with no genetic material was included to eliminate contamination or nonspecific reactions. The qRT-PCR primers for each gene were the following: FKS1, 5' - TCTGCGGATTTTCATTTTGGG - 3' and 5' - GTAGATTGGTGGGCGGATTTG - 3'; GFA1, 5' - AAGTCACTCAACGCATATCAGC - 3' and 5' - TGTAGGGGGATAACATTCAGC - 3'; GEL3, 5' - CGTTGTCAGCGGAGGTATCGTC - 3' and 5' - AGGGCAGGTTCGGAGTTCAGTG - 3'; L34, 5' - CGGCAACCTCAGATACCTTC - 3' and 5' - GGAGACCTGGGAGTATTCACG - 3'.

Cell wall analysis

To measure the amount of total carbohydrates and for confocal analysis, *Pb01* yeast cells were grown in liquid Fava-Netto's medium at 37°C for 72 h with or without stressor agents. Yeast cells were collected and washed successively with acetone, ethyl

alcohol and ether. The defatted cells were suspended in 50 mM Tris-HCl 50mM, pH 7.5 and disrupted with glass beads. Cell wall was separated from the cytosolic fraction by centrifugation at 3,500 *g* and washed with water (Kanetsuna and Carbonell, 1970). The cell wall was then boiled three times with Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, containing 50 mM EDTA, 2% SDS and 10 mM DTT, and washed extensively with water. The alkali-soluble (AS) fraction was extracted with 1N NaOH and 500 mM sodium borohydride and neutralized with acetic acid (Beauvais et al., 2005). Total carbohydrates were determined by the phenol sulfuric acid procedure with glucose as standard (Masuko et al., 2005). The amount of β -1,3-glucan in the alkali-insoluble (AI) and alkali-soluble (AS) fractions digested by β -1,3-glucanase was estimated by measuring the release of reducing sugars after digestion by the *p*-amino-hydroxibenzoic acid hydrazide method, as previously described (Beauvais et al., 2005). For digestion, the AI fraction was incubated with recombinant β -1,3-glucanase (Qbiogene, Morgan Irvine, CA, USA) (1500 U/mg dry weight of cell walls) at 25°C overnight.

To measure the amount of GlcNAc, approximately 2 mg (dry wt) of Pb01 yeast enriched cell wall fraction was subsequently hydrolyzed in 6 M HCl at 100°C for 4 h and then neutralized with NaOH. To each 1 mL of the sample, 0.1 mL of solution A (1.5 N Na₂CO₃ in 4% (w/v) acetylacetone) was added and the mixture was incubated at 100°C for 20 min. After cooling to room temperature, 0.7 mL of 96% (v/v) ethanol and 0.1 mL of solution B (1.6 g *p*-dimethylaminobenzaldehyde in 30 mL concentrate HCl and 30 mL of 96% (v/v) ethanol) was added and incubated for 1 h at room temperature. Absorbance at 520 nm was measured and compared to absorbance values from a standard curve of 0-100 mg glucosamine taken through the same reactions (Popolo et al., 1997).

Confocal analysis

For confocal microscopic analysis, *Pb01* yeast cells were grown in liquid Fava-Netto's medium at 37°C for 72 h with or without stressor agents. Briefly, the cells growing in different stress conditions were fixed in 4% paraformaldehyde for 1 h, washed and centrifuged. The cells were collected, stained with 100 μ g/mL CR in PBS for 30 min and washed with PBS. After mounting in 90% glycerol in PBS which was adjusted to pH 8.5 and contained an antifading agent (*p*-phenylenediamine 1 g/L) (Sigma-Aldrich), the specimens were analyzed under a Zeiss LSM 510 META confocal laser scanning microscope. Congo red was demonstrated to have an affinity for the cellulose-associated sites of various plants and was used as a fluorochrome applied for rapid detection of fungi (Slifkin and Cumbie, 1988). Congo red has a FW of 696.67 and its λ_{max} (absorbance) is 497 nm in water (Green, 1991).

Results

Sensitivity to stressors agents

To evaluate the action of stressor agents on *Pb01*, the concentration which does not completely inhibit fungus growth was identified according to figure 1. For each stressor agent, the sub-inhibitory concentrations were determined as follows: 27 mM for CFW; 35 mM for CR; 0.002% for SDS; 0.1 M for KCl; 1 M for NaCl and 1 M for sorbitol.

Transcript analysis by qRT-PCR under stress conditions

The expression of genes involved in the synthesis and assembly of the cell wall during stress conditions was evaluated. *Pb01* yeast cells were subjected to the sub-

inhibitory concentration of each stressor for 1 h at 37°C. Before RNA isolation, viability was analyzed by visualizing the cells with Trypan blue. As shown in figure 2A and Table 1, the relative expression level of *PbFKS1* increased after all the treatments; the greatest increase was caused by SDS. *PbGFA1* was up-regulated only after treatment with SDS and KCl; it was down-regulated by the other stressors. The other treatments led to its down regulation (Fig. 2B). *PbGEL3* was up-regulated after treatment with CFW, NaCl and sorbitol (Fig. 2C).

Carbohydrate content of the cell wall

The cell wall is divided into AS and AI fractions according to its solubility in alkali. In the *Pb01* yeast phase, the glucan polymer consisted mainly of α -1,3-glucan (95%), present in the AS fraction, and a small amount of the β -1,3-glucan (5%) present in the AI fraction (Kanetsuna et al., 1972). Figure 3A shows a shift in total carbohydrate content in the AS and AI fractions under stress conditions. The CFW, SDS, NaCl and sorbitol treatments resulted in an increase in total carbohydrate content in the cell wall. After treatment with CR, there was a decrease in AI fraction carbohydrate content. The KCl treatment caused a decrease in AS fraction carbohydrate content (Tab. 1).

These molecules were evaluated to determine possible alterations in cell wall β -1,3-glucan and GlcNAc residue content. β -1,3-glucan content was estimated after digestion of the AI cell wall fraction with the β -1,3-glucanase enzyme. As shown in figure 3B, there was an increase in β -1,3-glucan content in the cell wall AI fraction after treatment with all stressor agents. NaCl and sorbitol were the agents that caused the greatest increase of this polymer in cell wall AI fraction. After treatment with SDS and KCl there was an increase in GlcNAc residue content in the *Pb01* cell wall (Fig. 3C)

suggesting an increase in chitin. Table 1 provides a schematic comparison between transcript level and *P. brasiliensis* yeasts carbohydrate content in induced by stressors.

Cell analysis by confocal microscopy

To analyze yeast cell morphology after stress, the cells were grown in liquid medium for 72 h with the stressor agents and visualized by confocal microscopy. Stained yeast cell walls in the stressed cells showed a clear and sometimes irregular thickening in the cell wall. In cells treated with CFW, CR, SDS and KCl the thickening was observed mainly in mother cells (Fig. 4).

Discussion

This study showed that all the wall stressor agents (CFW, CR, SDS, KCl, NaCl, sorbitol) induced an up-regulation of *PbFKS1* transcripts and an increase in the amount of β -1,3-glucan residues in *P. brasiliensis* (Pb01). The *PbGFA1* and *PbGEL3* transcripts were up or down regulated and the behavior of *PbGFA1* and GlcNAC coincided. Morphologically, the stressors caused a thickening in the yeast wall which was detected by confocal microscopy.

The main constituents of the *P. brasiliensis* yeast phase cell wall are chitin, α -glucan and β -glucan polymers. The polysaccharide α -glucan is supposedly located in a more external region of the cell wall and is related to virulence (San-Blas, 1982; Silva et al., 1994). β -1,3-glucan and chitin are linked to the cell wall structural function. In addition, β -1,3-glucan is an immunogenic molecule. Total carbohydrate content of cell wall AI fraction, which contains β -1,3-glucan (Kanetsuna et al., 1972), increased after treatment with all the stressor agents but CR. β -1,3-glucan polymer increased after

digestion of cell wall AI fraction with β -1,3-glucanase in all treatments with stressor agents including CR. After treatment with CFW, SDS, NaCl and sorbitol, there was an increase in AS fraction carbohydrate content, indicating a probable increase in α -1,3-glucan content. The decrease in AI and AS fraction carbohydrate content in CR and KCl treatments, respectively, could be due to a decrease in the synthesis of other cell wall components such as galactose and mannose, which were not analyzed in this study.

Similar experiments with *S. cerevisiae* showed that after treatment with CFW there was an increase in β -glucan and chitin polymer content (Kuranda et al., 2006) and an up regulation of *FKS2* gene (de Nobel et al., 2000). Also, activation Rho1, the regulatory subunit of β -1,3-glucan synthase, caused cell wall integrity defects and had many downstream targets including protein kinase C and the *S. cerevisiae* subunits Fks1p and Fks2p (Popolo et al., 2001). Together with the biochemical analysis, these data strongly suggest that *PbFks1p* protein is involved in mechanisms compensating for cell wall damage.

An increase in chitin synthesis has been shown to be an important compensatory response to cell wall stress. The addition of cell wall disturbing compounds to *S. cerevisiae*, *Aspergillus niger* and *C. albicans* resulted in increased chitin levels and cell wall mutants (Lagorce et al., 2002; Munro et al., 2007; Ram et al., 2004). In *A. niger* the treatment with CFW and SDS caused up regulation of *gfaA*, which encodes a probable rate-limiting enzyme in chitin biosynthesis transcripts and consequently stimulates chitin biosynthesis (Ram et al., 2004). In *P. brasiliensis*, after treatment with SDS and KCl there was an up regulation of *PbGFA1* and an increase in GlcNAc residues, which are chitin polymer monomers. After treatment of *P. brasiliensis* with CFW and sorbitol there was a down regulation of *PbGFA1* and a decrease in GlcNAc residues. However, despite the down regulation of *PbGFA1* there was no significant alteration in GlcNAc

residue content in the CR treatment. Some stressors cause transient damage to the cell wall (Garcia et al., 2004) and the time necessary for the occurrence of compensatory mechanisms such as up regulation of genes responsible for cell wall synthesis or an increase in cell wall polymer can vary according to the stressor agent. These results suggest that *PbGFA1* could be activated under stress conditions but in a time-dependent manner.

The gel proteins (glucan-elongated protein) have β -1,3-glucanosyltransferase activity and act in the cross-linking of cell wall components in fungi. *PbGel3p* is functional in *S. cerevisiae* and suppresses both the morphological defects and the compensatory responses induced by the lack of its homologous Gas1p (Castro et al., 2009). Thus, it has been suggested that *PbGel3p* is also involved in *P. brasiliensis* cell wall assembly (Castro et al., 2009). In the presence of the cell wall stress caused by CFW, NaCl and sorbitol, there was an upregulation of *PbGEL3*. This increase was accompanied by an increase in the β -1,3-glucan polymer and probably contributed to the restoration of cell wall integrity.

Under stress conditions the cell wall becomes weakened and activates compensatory mechanisms. Here it was noted that among the compensatory mechanisms of *P. brasiliensis* there was an increase in the synthesis of cell wall components, such a β -1,3-glucan and chitin. This effect was manifested morphologically by a thickening of the cell wall observed by confocal analysis in *P. brasiliensis* yeast phase after treatment with stressor agents.

The results obtained in this study help to explain some of the adaptive mechanisms used by *P. brasiliensis* against damage caused by agents that attack cell wall integrity directly and increase medium osmolarity. When treated with zymoliase, a β -1,3-glucanase, sequential activation of two MAPKs pathways was observed in *S.*

cerevisiae: HOG, responsible for adaptation during osmotic stress and SLT2, responsible for adaptation against cell wall-damaging agents (Bermejo et al., 2008). Although this damage occurs through different pathways, it induces compensatory mechanisms for organism survival, indicating that differential regulation of cell wall stress responses seems to be a consequence, at least in part, of how cells are able to sense different types of stress (Arroyo et al., 2009).

Here it was observed that *PbFKS1*, *PbGFA1* and *PbGEL3* as well as β -1,3-glucan and GlcNAc residues are involved in the compensatory mechanisms of *P. brasiliensis* against cell wall damage. However, further investigation will be required to better explain the role of these molecules in the maintenance of *P. brasiliensis* cell wall integrity. This model offers the advantage of challenging the adaptive capability of *P. brasiliensis* with varied stress conditions.

Acknowledgments

This study at Universidade Federal de Goiás was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and by the International Foundation for Sciences (IFS), Stockholm, Sweden, through a grant to M.P. P.K.T. was supported by a fellowship from CNPq.

References

Arroyo J, Bermejo C, Garcia R, Rodriguez-Pena JM, 2009. Genomics in the detection of damage in microbial systems: cell wall stress in yeast. *Clin Microbiol Infect* **15** Suppl 1: 44-6.

Bastos KP, Bailao AM, Borges CL, Faria FP, Felipe MS, Silva MG, Martins WS, Fiuza RB, Pereira M, Soares CMA, 2007. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol* **7**: 29.

Beauvais A, Maubon D, Park S, Morelle W, Tanguy M, Huerre M, Perlin DS, Latge JP, 2005. Two α (1-3) glucan synthases with different functions in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* **71**(3): 1531-8.

Bermejo C, Rodriguez E, Garcia R, Rodriguez-Pena JM, Rodriguez de la Concepcion ML, Rivas C, Arias P, Nombela C, Posas F, Arroyo J, 2008. The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Mol Biol Cell* **19**(3): 1113-24.

Carbonell LM, Kanetsuna F, Gil F, 1970. Chemical morphology of glucan and chitin in the cell wall of the yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* **101**(2): 636-42.

Castro NS, de Castro KP, Orlandi I, Feitosa LS, Rosa e Silva LK, Vainstein MH, Bao SN, Vai M, Soares CMA, 2009. Characterization and functional analysis of the beta-

1,3-glucanosyltransferase 3 of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Yeast Res* **9**(1): 103-14.

da Silva Neto BR, de Fatima da Silva J, Mendes-Giannini MJ, Lenzi HL, Soares CMA, Pereira M, 2009. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. *BMC Microbiol* **9**: 272.

Damveld RA, Arentshorst M, Franken A, vanKuyk PA, Klis FM, van den Hondel CA, Ram AF, 2005a. The *Aspergillus niger* MADS-box transcription factor RlmA is required for cell wall reinforcement in response to cell wall stress. *Mol Microbiol* **58**(1): 305-19.

Damveld RA, vanKuyk PA, Arentshorst M, Klis FM, van den Hondel CA, Ram AF, 2005b. Expression of *agsA*, one of five 1,3- α -D-glucan synthase-encoding genes in *Aspergillus niger*, is induced in response to cell wall stress. *Fungal Genet Biol* **42**(2): 165-77.

de Nobel H, Ruiz C, Martin H, Morris W, Brul S, Molina M, Klis FM, 2000. Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology* **146** (Pt 9): 2121-32.

Fernandes L, Araujo MA, Amaral A, Reis VC, Martins NF, Felipe MS, 2005. Cell signaling pathways in *Paracoccidioides brasiliensis*-inferred from comparisons with other fungi. *Genet Mol Res* **4**(2): 216-31.

Fujioka T, Mizutani O, Furukawa K, Sato N, Yoshimi A, Yamagata Y, Nakajima T, Abe K, 2007. MpkA-Dependent and -independent cell wall integrity signaling in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **6**(8): 1497-510.

Garcia R, Bermejo C, Grau C, Perez R, Rodriguez-Pena JM, Francois J, Nombela C, Arroyo J, 2004. The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem* **279**(15): 15183-95.

Green FG, 1991. The Sigma-Aldrich handbook of stains, dyes and indicators. Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wisconsin, 776 pp.

Kanetsuna F, Carbonell LM, 1970. Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* **101**(3): 675-80.

Kanetsuna F, Carbonell LM, Azuma I, Yamamura Y, 1972. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* **110**(1): 208-18.

Klis FM, Boorsma A, de Groot PW, 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**(3): 185-202.

Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Brul S, 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **26**(3): 239-56.

Kojima K, Bahn YS, Heitman J, 2006. Calcineurin, Mpk1 and Hog1 MAPK pathways independently control fludioxonil antifungal sensitivity in *Cryptococcus neoformans*.

Microbiology 152(Pt 3): 591-604.

Kuranda K, Leberre V, Sokol S, Palamarczyk G, Francois J, 2006. Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol Microbiol* **61**(5): 1147-66.

Lagorce A, Le Berre-Anton V, Aguilar-Uscanga B, Martin-Yken H, Dagkessamanskaia A, Francois J, 2002. Involvement of GFA1, which encodes glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase, in the activation of the chitin synthesis pathway in response to cell-wall defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **269**(6): 1697-707.

Lesage G, Bussey H, 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**(2): 317-43.

Levin DE, 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**(2): 262-291.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**(4): 402-8.

Madrid M, Nunez A, Soto T, Vicente-Soler J, Gacto M, Cansado J, 2007. Stress-activated protein kinase-mediated down-regulation of the cell integrity pathway mitogen-activated protein kinase Pmk1p by protein phosphatases. *Mol Biol Cell* **18**(11): 4405-19.

Masuko T, Minami A, Iwasaki N, Majima T, Nishimura S, Lee YC, 2005. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Anal Biochem* **339**(1): 69-72.

Munro CA, Selvaggini S, de Bruijn I, Walker L, Lenardon MD, Gerssen B, Milne S, Brown AJ, Gow NA, 2007. The PKC, HOG and Ca^{2+} signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **63**(5): 1399-413.

Navarro-Garcia F, Eisman B, Fiuza SM, Nombela C, Pla J, 2005. The MAP kinase Mkc1p is activated under different stress conditions in *Candida albicans*. *Microbiology* **151**(Pt 8): 2737-49.

Pereira, M., Felipe, M. S., Brigido, M. M., Soares, C. M. A. and Azevedo, M. O. (2000). Molecular cloning and characterization of a glucan synthase gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast* **16**(5): 451-62.

Plaine A, Walker L, da Costa G, Mora-Montes HM, McKinnon A, Gow NA, Gaillardin C, Munro CA, Richard ML, 2008. Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity. *Fungal Genet Biol* **45**(10): 1404-14.

Popolo L, Gilardelli D, Bonfante P, Vai M, 1997. Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the ggp1 delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**(2): 463-9.

Popolo L, Gualtieri T, Ragni E, 2001. The yeast cell-wall salvage pathway. *Med Mycol* **39** Suppl 1: 111-21.

Ram AF, Arentshorst M, Damveld RA, vanKuyk PA, Klis FM, van den Hondel CA, 2004. The cell wall stress response in *Aspergillus niger* involves increased expression of the glutamine : fructose-6-phosphate amidotransferase-encoding gene (gfaA) and increased deposition of chitin in the cell wall. *Microbiology* **150**(Pt 10): 3315-26.

Ram AF, Klis FM, 2006. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nat Protoc* **1**(5): 2253-6.

Restrepo A, 1985. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia* **23**(5): 323-34.

San-Blas G, 1982. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationships. *Mycopathologia* **79**(3): 159-84.

San-Blas G, 1993. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* **31**(2): 99-113.

Silva SP, Felipe MSS, Pereira M, Azevedo MO, Soares CMA, 1994. Phase transition and stage-specific protein synthesis in the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exp Mycol* **18**: 294-299.

Slifkin M, Cumbie R, 1988. Congo red as a fluorochrome for the rapid detection of fungi. *J Clin Microbiol* **26**(5): 827-30.

Thomé PE, 2007. Cell wall involvement in the glycerol response to high osmolarity in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Antonie van Leeuwenhoek* **91**: 229-235.

Zambuzzi-Carvalho PF, Cruz AH, Santos-Silva LK, Goes AM, Soares CM, Pereira M, 2009. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 is required in the glyoxylate cycle and in the allantoin degradation pathway. *Med Mycol* **47**(7): 734-44.

Figure legends

Figure 1- Stress sensitivity analysis of *P. brasiliensis* yeast cells. *P. brasiliensis* yeast cells were grown in Fava-Netto's medium for 16 hours. Samples containing 10^6 , 10^5 and 10^4 cells were spotted onto Fava-Netto plates supplemented with CFW, CR, SDS, KCl, NaCl and sorbitol in the concentrations indicated. The plates were incubated for 7 days at 37°C before photo-documentation.

Figure 2- Evaluation of the expression level of *PbFKS1*, *PbGFA1* and *PbGEL3* transcripts under stress conditions. *P. brasiliensis* yeast cells were incubated with the stressor agents CFW, CR, SDS, KCl, NaCl and sorbitol at the sub-inhibitory

concentration for 1 h with water as the control. Total RNA was isolated for each condition and qRT-PCR was performed. The $\Delta\Delta CT$ method was used to calculate the relative amount of specific RNA contained in each sample. The L34 gene was used to normalize each reaction. Bars indicate SD of three independent experiments. (A) Relative expression of *PbFKS1*. (B) Relative expression of *PbGFA1*. (C) Relative expression of *PbGEL3*. *Significantly increased expression ($p \leq 0.05$).

Figure 3- Carbohydrate content in the cell wall of *P. brasiliensis* yeast cells under stress conditions. The cell wall of *P. brasiliensis* untreated (control) and treated with CFW, CR, SDS, KCl, NaCl and sorbitol stressor agents, was isolated. The alkali-soluble (AS) and alkali-insoluble (AI) fractions were separated. (A) Total amount of carbohydrates was measured in the AS and AI fractions. (B) Amount of the β -1,3-glucan polymer was estimated in the AI fraction. (C) Amount of GlcNAc residue was measured in total cell wall fraction. All data were normalized relative to the control. Bars indicate SD of three independent experiments. *Significantly increased amount ($p \leq 0.05$).

Figure 4- Analysis of the *P. brasiliensis* yeast cells by confocal microscopy. After incubation in medium with stressors, fungi cells showed cell wall thickening mainly in the mother cells. The thickening was sometimes asymmetric and not diffuse.

Table 1 - Comparison between transcripts level of *P. brasiliensis* 1,3- β -D-glucan synthase gene (*PbFKSI*), *P. brasiliensis* glucosamine-6-phosphate synthase gene (*PbGFAI*), *P. brasiliensis* β -1,3-glucanotransferase 3; total carbohydrate content in alkali-soluble (AS) and alkali-insoluble (AI) fractions and 1,3- β -D-glucan and N-acetylglucosamine contents after treatment with stressor agents.

Stressor agents	<i>PbFKSI</i>	<i>PbGFAI</i>	<i>PbGEL3</i>	AS/AI	β -1,3 gluc	GlcNAc
CFW	↑	↓	↑	↑/↑	↑	↓
CR	↑	↓	↓	-/↑	↑	-
SDS	↑↑	↑	-	↑/↑	↑	↑↑
KCl	↑	↑	-	↑/-	↑	↑
NaCl	↑	-	↑↑	↑/↑	↑↑	-
sorbitol	↑	↓	↑↑↑	↑/↑	↑↑	↓

(↑) up-regulation; (↓) down-regulation; (-) no effect; Calcofluor White (CFW), Congo Red (CR), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS).

Figure 1

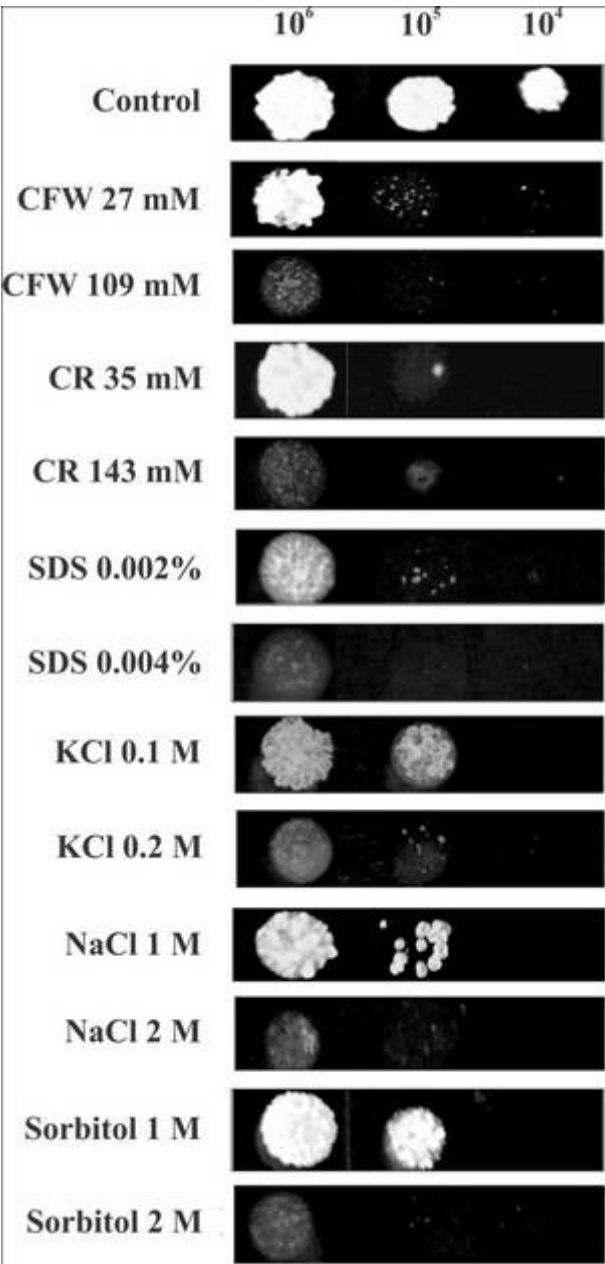


Figure 2

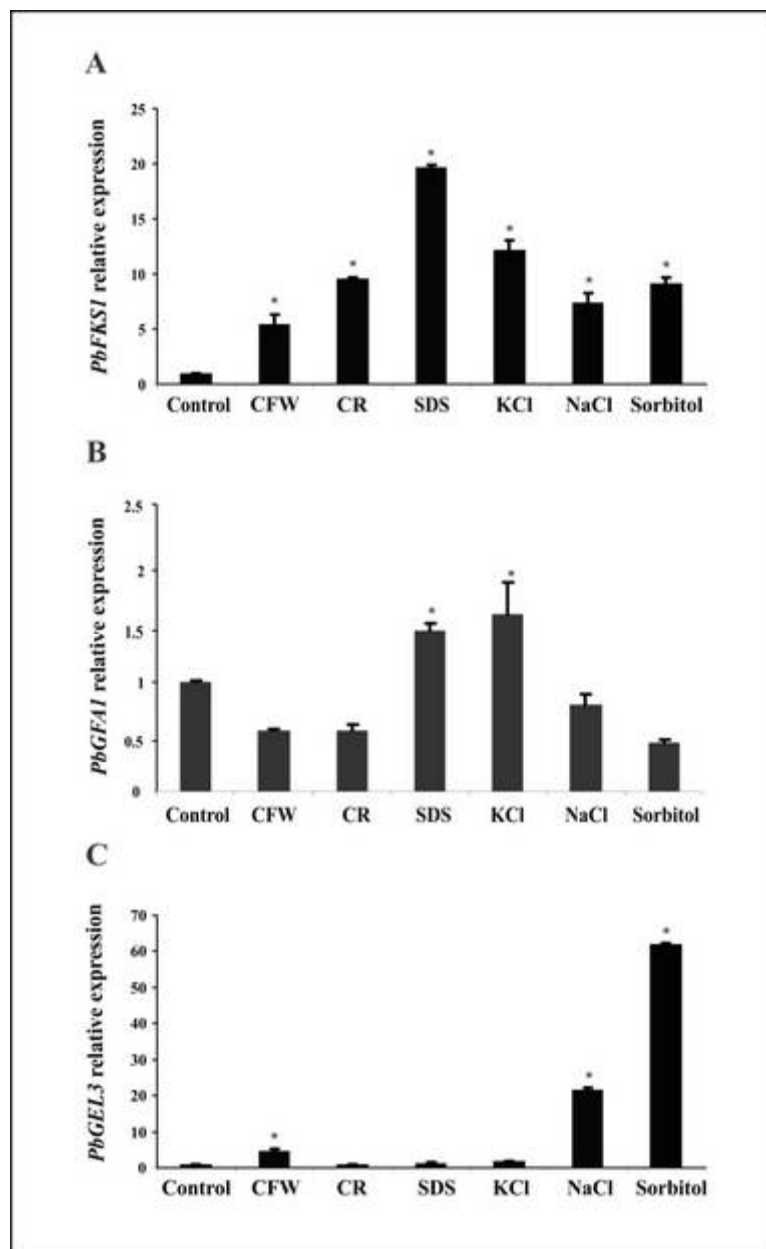


Figure 3

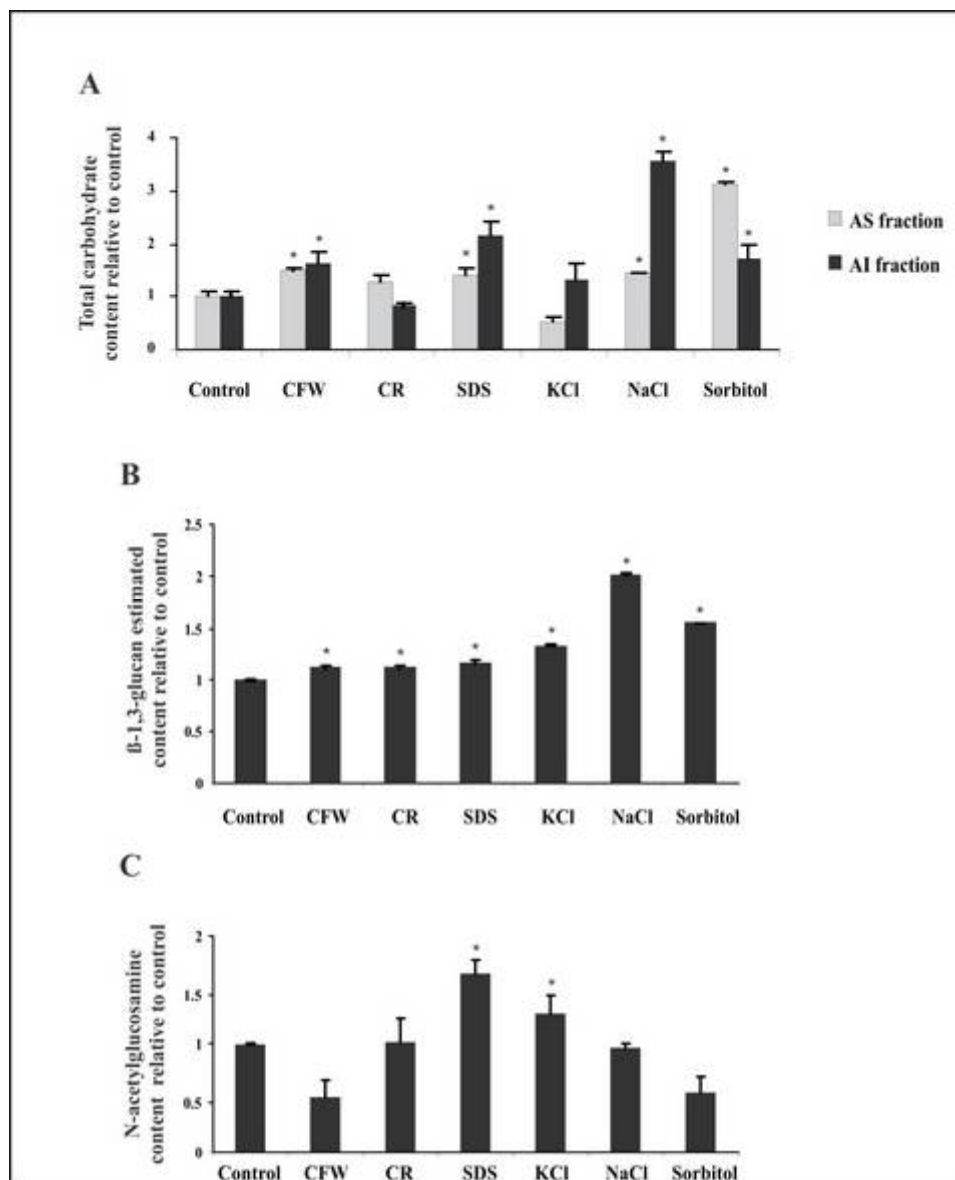
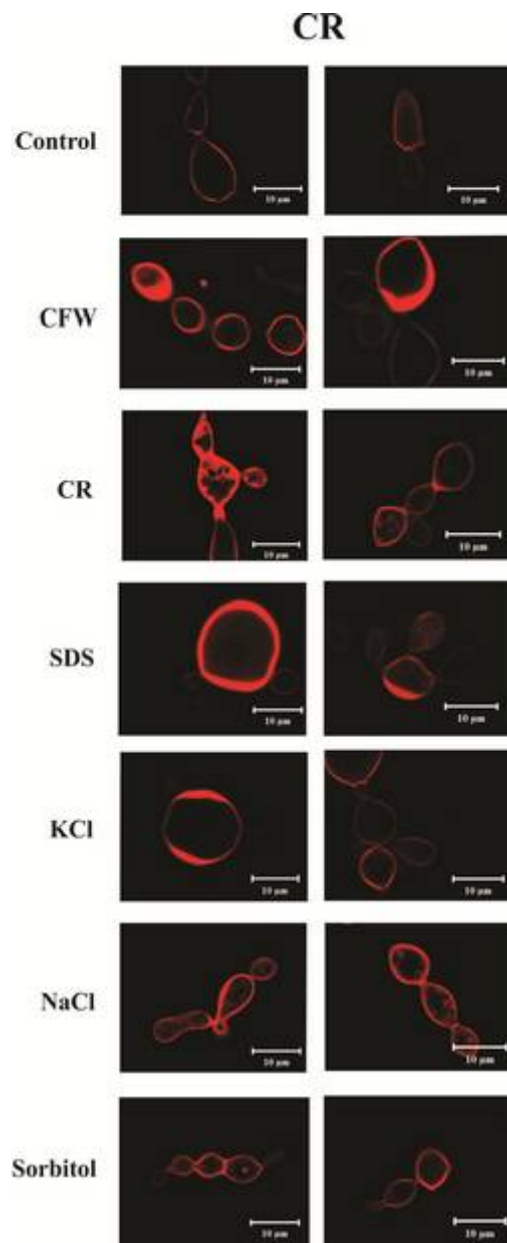


Figure 4



Capítulo III

Manuscrito

**1,3- β -D-glucan synthase of *Paracoccidioides brasiliensis*:
recombinant protein, expression and cytolocalization in
the yeast and mycelium phases**

Accepted Manuscript

Title: 1,3- β -D-glucan synthase of *Paracoccidioides brasiliensis*: recombinant protein, expression and cytolocalization in the yeast and mycelium phases

Authors: Patrícia Kott Tomazett, Carlos Roberto Félix, Henrique Leonel Lenzi, Fabrícia de Paula Faria, Célia Maria de Almeida Soares, Maristela Pereira



PII: S1878-6146(10)00119-4

DOI: [10.1016/j.funbio.2010.07.007](https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.07.007)

Reference: FUNBIO 74

To appear in: *Mycological Research*

Received Date: 21 May 2010

Revised Date: 27 July 2010

Accepted Date: 29 July 2010

Please cite this article as: Tomazett, P.K., Félix, C.R., Lenzi, H.L., de Paula Faria, F., de Almeida Soares, C.M., Pereira, M. 1,3- β -D-glucan synthase of *Paracoccidioides brasiliensis*: recombinant protein, expression and cytolocalization in the yeast and mycelium phases, *Mycological Research* (2010), doi: 10.1016/j.funbio.2010.07.007

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

1,3- β -D-glucan synthase of *Paracoccidioides brasiliensis*: recombinant protein, expression and cytolocalization in the yeast and mycelium phases

Patrícia Kott Tomazett^a, Carlos Roberto Félix^b, Henrique Leonel Lenzi^c, Fabrícia de Paula Faria^a, Célia Maria de Almeida Soares^a, Maristela Pereira^{a*}

^aLaboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, C.P. 131, 74001-970, Goiânia, GO, Brazil. ^bLaboratório de Enzimologia, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil, ^cLaboratório de Patologia, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*Corresponding author

Maristela Pereira

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Campus II, Universidade Federal de Goiás, C.P. 131, 74001-970 Goiânia, GO, Brazil.

E-mail address: mani@icb.ufg.br

Tel./fax: +55 62 35211110

Abstract

Paracoccidioides brasiliensis is a thermo-dimorphic human pathogenic fungus that in the mycelium phase lives at 23°C in environment and in the yeast phase at 37°C in the host tissues. In *P. brasiliensis*, the main polymers that compound the cell wall are chitin, 1,3- β -D-glucan and 1,3- α -glucan. They make a primary barrier responsible for the structural integrity and form of the cell wall. In *Paracoccidioides brasiliensis*, just one homologue of 1,3- β -D-glucan synthase gene (*PbFKS1*) was found. Here, the active recombinant protein (*PbFks1pc*) containing the catalytic region was obtained in *Escherichia coli*. In addition, a paradoxical dissociation was detected between the expression of the *PbFKS1* transcript and the level of the corresponding protein *PbFks1p*, which was higher in the yeast phase, versus the amount of 1,3- β -D-glucan polymer, which was higher in the mycelium phase. Western blot analysis using protein extracts of cellular fractions showed that *PbFks1p* is present in the membrane enriched fraction of mycelium and yeast cells and in the cell wall enriched fractions of yeast cells. Confocal-immunocytolocalization of *PbFks1p* identified the protein in the apical growing region of the mycelium and distributed on the surface of the yeast cell. Two possible mechanisms could explain the above-mentioned discrepancy between the data: (a) overexpression of Rho1 GTPase as a regulator of 1,3- β -D-glucan synthase; (b) possible post-translational regulation of *PbFks1p* in *P. brasiliensis* isolates.

Introduction

Biochemical and electron microscopy studies have shown differences in the composition of the cell wall of the two life phases of the dimorphic human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (Carbonell and Kanetsuna, 1970; Kanetsuna et al., 1972). The cell wall of the yeast phase, found in tissues and *in vitro* at 37°C, has a larger amount of chitin than during the mycelial phase, found *in vitro* at 23°C and in the soil. In both phases, 40% of the cell wall is composed of glucan. In the yeast phase, 1,3- α -glucan is the main cell wall polymer and only 4-5% corresponds to the 1,3- β -D-glucan polymer. However, the mycelium phase contains mainly 1,3- β -D-glucan (Kanetsuna et al., 1972).

1,3- β -D-glucan and chitin polymers are related to the structural function of the cell wall. Also, it has been proposed that β -glucan is an immunogenic molecule that induces inflammation in the host (reviewed by Brown, 2006; Silva et al., 1994). It induces proliferation of lymphocyte and dendrite cells and potentiates allergy in *Candida albicans* (Inoue et al., 2009).

1,3- β -D-glucan is an essential cell wall component in fungi and plays a critical role in cell viability. The synthesis of β -1,3-glucan is performed by a multi-enzymatic complex composed of catalytic and regulatory subunits. The enzyme 1,3- β -D-glucan synthase (Fks) (UDP-glucose: 1,3- β -D-glucan 3- β -D-glucanosyltransferase; EC 2.4.1.34) catalyzes the addition of UDP-glucose to the 1,3- β -D-glucan polymer, inducing rigidity of the yeast cell wall (Inoue et al., 1996). In *Saccharomyces cerevisiae*, Fks is localized on the plasma membrane (Utsugi et al., 2002), and is regulated by members of the Rho-GTPase family. The activity of Rho-type GTPase is generally regulated by switching between a GDP-

bound inactive state and a GTP-bound active state with conformational changes in *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus nidulans* and *S. cerevisiae* (Arellano et al., 1996; Guest et al., 2004; Roh et al., 2002). Deletion of the gene(s) encoding the FKS subunit(s) of 1,3- β -D-glucan synthase is lethal in fungi like *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides posadasii*, *Aspergillus fumigatus* (Beauvais et al., 2001; Beauvais et al., 2005; Kellner et al., 2005; Mazur et al., 1995; Mio et al., 1997; Thompson et al., 1999).

In *P. brasiliensis*, one gene encoding a homologue of 1,3- β -D-glucan synthase (*PbFKS1*) was cloned and characterized (Pereira et al., 2000). The presence of only one homologous gene was confirmed by analysis of the structural genome of *P. brasiliensis* and isolates *Pb01*, *Pb03* and *Pb18* (<http://www.broad.mit.edu/science/projects/msc/data-release-summary>). Here we analyze the *PbFKS1* transcript, protein and 1,3- β -D-glucan polymer levels in mycelium and yeast cells. Also, we reported the production of the active recombinant protein concerning to putative catalytic region of *PbFKS1* (*PbFks1pc*) as well as *PbFks1p* immunocytolocalization in *P. brasiliensis* mycelium and yeast cells.

Material and Methods

P. brasiliensis isolate and culture conditions

P. brasiliensis *Pb01* isolate (ATCC MYA-826) has been studied in our laboratory (da Silva Neto et al., 2009; Zambuzzi-Carvalho et al., 2009). It was cultivated in semisolid Fava-Netto's medium (1.0% 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, 4% w/v glucose and 1.4% w/v agar, pH 7.2) at 23°C for the mycelium phase and at 37°C for growth of the yeast phase.

Quantitative real time PCR (qRT-PCR)

Total RNA of *P. brasiliensis* Pb01 mycelium and yeast cells was extracted using Trizol (Invitrogen, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The quality of RNA was assessed using the A260nm/A280 nm ratio, and by visualization of rRNA using 1.2% (w/v) agarose gel electrophoresis. This protocol has been used in our lab, and is sufficient to disrupt the cell wall and release RNAs (Castro et al. 2009; Zambuzzi-Carvalho et al., 2009). The RNAs were used to construct single-stranded cDNAs using a reverse transcription system (Promega, WI, USA) following the recommendations of the manufacturer. The RNAs were previously treated with DNase to eliminate genomic DNA and the same reactions were performed in the presence or absence of reverse transcriptase as a control for genomic contamination. qRT-PCR reactions were conducted in an IQ5 real-time PCR detection system. The PCR thermal cycling conditions were as follows: an initial step at 50°C for 2 min, followed by 5 min at 95°C, and 40 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 10 s and 72°C for 15 s. Invitrogen Platinum SYBR Green qPCR Supermix was used as a reaction mixture, with the addition of 10 pmol of each primer and 1 µL of template cDNA, in a final volume of 25 µL. Each cDNA sample was analyzed in triplicate with each primer pair. A melting curve analysis was performed at the end of the reaction to confirm a single PCR product. The data were normalized with ribosomal protein L34 amplified in each set of QRT-PCR experiments, since Castro et al. (2009) showed that the expression of L34 is constant between the two phases of *P. brasiliensis*. The relative expression data were

obtained using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). A nontemplate control with no genetic material was included to eliminate contamination or nonspecific reactions. The qRT-PCR primers for each gene were as follows: FKS1, 5' - TCTGCGGATTTCATTTTGGG – 3' and 5' - GTAGATTGGTGGGCGGATTG – 3'; L34, 5'- CGGCAACCTCAGATACCTTC-3' and 5'-GGAGACCT GGGAGTATTCACG-3'.

Cloning of *PbFKS1* into expression vector

The catalytic region of *PbFKS1* was obtained by PCR using a forward primer including an *EcoRI* site (underlined; 5'-TGGAGGAATTCTTTCTCTCGCCTACCCAAGC-3') and a reverse primer containing a *NotI* site (underlined; 5'-ATGCGGCCGCCACGAAGAAGCGCATTCATTCC-3') derived from *PbFKS1* cDNA. The amplification parameters were the following: an initial denaturation step at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 54°C for 2 min, and extension at 72°C for 2 min. The PCR fragment was cloned into the *EcoRI/NotI* site of pGEX-4T-3 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) in fusion with glutathione S-transferase (GST). The recombinant plasmid *PbFKS1c* was used to transform *E. coli* BL-21 (pLys) competent cells by the heat shock method (Sambrook and Russel, 2001). Ampicillin-resistant transformants were cultured, and plasmid DNA was analyzed by PCR.

Heterologous expression and purification of *PbFks1pc*

Escherichia coli transformed with the catalytic region of *PbFks1* were grown in LB medium supplemented with ampicillin (100 µg/mL) at 37°C until the optical density at 600 nm reached 0.8. Protein expression was induced by adding IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) to a final concentration of 0.5 mM to the culture. After 1 h, the bacterial cells were harvested by centrifugation at 5,000 *g* and resuspended in lyses buffer containing 50 mM Tris-HCl pH7.5, 200 mM NaCl and 0.75% Sarkosyl for the purpose of solubilizing the protein from inclusion bodies. The protein was frozen in liquid nitrogen three times to improve solubilization followed by centrifugation at 10,000 *g*. The soluble protein was then incubated with a glutathione sepharose (GE Healthcare) for 1 h at room temperature. After that, the affinity matrix was washed four times with the lysis buffer and the protein was cleaved with thrombin protease (50 U/mL) and collected after overnight incubation. The purity and size of the recombinant protein were evaluated by running the purified molecule through a 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to Laemmli (Laemmli, 1970). Proteins were visualized by Coomassie blue staining.

Antibody production

The purified *PbFks1pc* was used to produce anti-*PbFks1pc* antibody in rabbits. Rabbit preimmune serum was obtained and stored at -20°C. The immunization protocol consisted of an initial injection of 150 µg of purified recombinant protein in complete Freund's adjuvant and three subsequent injections of the same amount of the antigen in incomplete Freund's adjuvant. The immunizations were done at two-week intervals. After

the fourth immunization, the serum containing the anti-*PbFks1pc* antibody was collected and stored at -20°C. The serum antibody concentration was determined by dot blot.

Preparation of *P. brasiliensis* cellular extracts

Pb01 mycelium and yeasts cells were suspended in buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA and 4 mM DTT and disrupted using glass beads. The cell wall fraction was separated from the soluble fraction by centrifugation at 3,500 *g*. The supernatant was further centrifuged at 100,000 *g* for 1 h and the sediment containing membrane-enriched fraction was suspended in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 as described by (San-Blas and San-Blas, 1982). The membrane-enriched fraction was used as the source of 1,3- β -D-glucan synthase for enzymatic assay. The cell wall-enriched fraction was extracted according to Castro et al., (2008) without cleavage with endo-1,3- β -glucanase and endoglucosidase H. The protein content from soluble fraction, cell wall-enriched fraction and membrane-enriched fraction was measured according to the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as the standard.

Western blot analysis

PbFks1pc, *Pb01* soluble fraction, cell wall-enriched fraction and membrane-enriched fraction proteins from both phases were electrophoresed, transferred to a nylon membrane and checked by Ponceau S to determine equal loading. To improve the quality of the samples, a clean-up kit (GE Healthcare) that reduces streaking, background staining, and other artifacts due to interfering contaminants was used; *PbFks1p* and *PbFks1pc* were detected using anti-*PbFks1pc* antibody. After reaction with alkaline phosphatase anti-rabbit

immunoglobulin G (IgG), the reaction was developed with 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate-nitroblue tetrazolium (BCIP-NBT). For electrophoresis and Western blot experiments, the same protein amount (100 µg) from soluble fraction, cell wall-enriched fraction and membrane-enriched fraction were used. The images were acquired by scanning and the bands were quantified with Scion Image Beta 4.03.

Enzymatic assay

Glucan synthesis was followed by measurement the incorporation rate of radioactivity from UDP-[¹⁴C]glucose according to Billon-Grand et al. (1997) through the radioactive method with some modifications. In a final volume of 360 µL, approximately 600 µg of freshly prepared membrane-enriched fraction or 4 µg of the *PbFks1pc*, 20 mM Tris-HCl pH 7.0 buffer, 100 mM cellobiose, 15 mM DTT, 20 mM UDPglucose and 3.5 µM UDP[¹⁴C]glucose (specific activity >200 mCi/mmol; GE Healthcare) were incubated at 37°C for 1 h. Reactions were terminated by addition of 2 mL 95% ethanol and precipitated overnight at -20°C. After addition of powdered cellulose, the reaction products were filtered through glass-fiber filters. Residues on the filter were then washed twice with 4 mL of water and twice with 4 mL of 95% ethanol. The incorporation of radioactive glucose into ethanol-insoluble glucans was determined in a Packard 1600 TR Liquid Scintillation Analyser with a 95%-efficiency fluor scintillation mixture (Sigma, MO, USA). All the results presented are representative data from duplicate experiments. Membrane-enriched fraction and *PbFks1pc* proteins were thermally denatured and used in the experiments as negative controls.

Confocal analysis

The cellular localization of the *PbFks1p* was performed as previously described (da Silva Neto et al., 2009) for confocal laser scanning microscopy. Briefly, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min, washed and centrifuged. After permeabilization with Triton X-100, the cells were washed in PBS and incubated in blocking solution (2.5% BSA, 1% skim milk, 8% fetal calf serum) for 20 min. The diluted (1:20) primary anti-*PbFks1p* antibody was added overnight at 4°C. After washing three times with PBS, the cells were incubated with secondary antibody (Alexa Fluor 488 Anti-rabbit Molecular Probes 1:500) for 1 hour. The cells were mounted in 90% glycerol PBS containing antifading agent (p-phenylenediamine 1 g/L) (Sigma) and adjusted to pH 8.5. The specimens were analyzed by laser confocal microscopy (Zeiss LSM 510-META).

1,3- β -D-glucan content of the cell wall

To measure the amount of 1,3- β -D-glucan on the cell wall, *Pb01* mycelium and yeast cells were grown in liquid Fava-Netto's medium at 23°C and 37°C respectively for 72 h. Cells were collected and washed successively with acetone, ethyl alcohol and ether. The defatted cells were suspended in 50 mM Tris-HCl 50mM, pH 7.5 and disrupted with glass beads. Cell wall was separated from the cytosolic fraction by centrifugation at 3,500 *g* and washed with water (Kanetsuna and Carbonell, 1970). The cell wall was then boiled three times with Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, containing 50 mM EDTA, 2% SDS and 10 mM DTT and washed extensively with water, resulting in the cell wall-enriched fraction. The alkali-insoluble (AI) and alkali-soluble (AS) fractions were extracted with 1N NaOH and 500 mM sodium borohydride and the AS fraction was neutralized with acetic acid (Beauvais et

al., 2005). The amount of 1,3- β -D-glucan digested by 1,3- β -glucanase was quantified by measuring the release of reducing sugars after digestion by the *p*-amino-hydroxibenzoic acid hydrazide method with glucose as standard, as previously described (Beauvais et al., 2005). For digestion, fractions were incubated with recombinant 1,3- β -glucanase (Qbiogene, CA, USA) (dry weight of cell wall: 1500 U/mg) at 25°C overnight.

Results

Transcript analysis by qRT-PCR

To investigate the *PbFKS1* transcript level, cDNAs derived from mycelium and yeast cells of the *Pb01* isolate were obtained and used in qRT-PCR analysis. The L34 mRNA was used as a reference transcript, since the expression of the L34 gene does not fluctuate significantly in *Pb01* (Castro et al., 2009). As shown in figure 1, the *PbFKS1* transcript level in the yeast phase was five times higher than in the mycelium phase.

Heterologous expression, purification and antibody production to *PbFks1p*

Since the native protein *PbFks1p* is very large (212 kDa) and has a highly hydrophobic 16 transmembrane helix, we decided to express only the corresponding segment, probably related to the catalytic region (57 kDa; from 796 to 1331 amino acid) from the *PbFks1p*, which is a hydrophilic domain. In this way, the nucleotides corresponding to the *PbFKS1* catalytic region were amplified by PCR and cloned into an expression vector. Bacterial clones holding the recombinant plasmid were selected to

induce recombinant protein expression, which was evaluated by SDS-PAGE gel electrophoresis.

Figure 2 shows *E. coli* BL-21 (pLys) cells before (Fig. 2A, lane 1) and after (Fig. 2A, lane 2) 1 h of incubation with 0.5 mM IPTG. The recombinant fusion protein of 83 kDa corresponds to the predicted molecular size of the recombinant protein (57 kDa) including GST (26 kDa). After solubilization, *PbFks1pc* was purified in its fused form by affinity chromatography (Fig. 2A, lane 3). Following cleavage with thrombin, two proteins of 57 kDa and 26 kDa corresponding to *PbFks1pc* and GST proteins, respectively, were visualized (Fig. 2A, lane 4).

PbFks1pc was used to generate antibody in rabbits. The fusion and purified *PbFks1pc* were subjected to SDS-PAGE analysis, blotted onto nylon membrane and reacted to the anti-*PbFks1pc* antibody. Positive reactions were visualized to fusion (Fig. 2B, lane 1) and purified (Fig. 2B, lane 2) *PbFks1pc*. No cross-reactivity to the rabbit preimmune serum was evidenced with the fusion (Fig. 2C, lane 1) or the purified (Fig. 2C, lane 2) protein.

Since *PbFks1pc* corresponds to the catalytic region only, we investigated its enzymatic activity. UDP[¹⁴C]glucose, the specific substrate of 1,3-β-D-glucan synthase, was incubated in the presence of membrane-enriched fraction or *PbFks1pc* with both thermally denatured proteins as controls. The incorporation of glucose into the reaction product was measured using scintillation counting (counts per minute/cpm). In both reactions the initial glucose incorporation was about 0.5×10^{-8} nM. After incubation of 1 hour with UDP[¹⁴C]glucose, the incorporation of glucose in the reaction with membrane-enriched fraction was 2.36×10^{-8} nM and in the reaction with *PbFks1pc*, the incorporation

of glucose was 1.21×10^{-8} nM. These data are summarized in Table 1 and show that *PbFks1p* was expressed in its active form. The data shown in Table 1 were subtracted from values obtained from the negative control (membrane-enriched fraction and *PbFks1p* proteins thermally denatured).

Detection of *PbFks1p* in the cellular fractions of yeast and mycelium phases

The cellular distribution of *PbFks1p* was investigated in the soluble fraction, cell wall enriched fraction and membrane fraction of *Pb01* mycelium and yeast cells. Proteins from these fractions were subjected to SDS-PAGE analysis, blotted onto nylon membrane and reacted to an antibody produced against the active recombinant *PbFks1p* (anti-*PbFks1p*). No reaction was detected in the soluble fraction (Fig. 3A, lane 1 and 4). *PbFks1p* was detected in the membrane fraction of the mycelium phase (Fig. 3A, lane 3) and cell wall-enriched fraction (Fig. 3A, lane 5) and membrane fraction (Fig. 3A, lane 6) in the yeast phase. For better visualization, Scion Image Beta 4.03 was used for a densitometric analysis. The relative amount of *PbFks1p* recognized by anti-*PbFks1p* antibody in the membrane fraction of mycelium and yeast cells was calculated. The detection of *PbFks1p* was almost three times as high in yeast as in the mycelium phase (Fig. 3B) corroborating the results obtained by transcript level.

Cellular localization of *PbFks1p* by confocal microscopy

To investigate the cellular location of *PbFks1p*, *Pb01* mycelium and yeast cells were grown in rich medium and visualized by laser confocal microscopy. No cross reaction was observed with the pre-immune serum (data not shown). The expression of *PbFks1p*

was observed in the cell surface in both the mycelium and yeast phases of *Pb01* (Fig. 4). In the mycelium there was a higher quantity of fluorescence in the apex of the hyphae suggesting that *PbFks1p* is located in the apical growing region of the mycelium. A uniform fluorescence was observed on the surface of yeast cells, indicating the presence of the protein on the cell surface.

Carbohydrates content of the cell wall

The cell wall is divided in AI and AS fractions according to its solubility in alkali. In the yeast phase of *Pb7193*, the glucan polymer consists mainly of 1,3- α -glucan (95%) in the AS fraction. There is a small amount of 1,3- β -D-glucan (5%) in the AI fraction in the yeast phase and in both fractions in the mycelium phase. Here we evaluate the amount of cell wall 1,3- β -D-glucan in the yeast phase and mycelium of *P. brasiliensis*. In accordance with our findings there was no significant difference in the amount of 1,3- β -D-glucan in the AI and AS fractions of two phases. However the amount of 1,3- β -D-glucan is almost 4 times higher in the mycelium phase than in the yeast phase in AI and AS fractions (Fig. 5).

Discussion

Here, the active recombinant protein, *PbFks1pc*, relating to the catalytic region, was obtained in *E. coli*, and a paradoxical dissociation was detected between the expression of *PbFKS1* transcript and the corresponding protein *PbFks1p* level, which were higher in the yeast phase, and the amount of 1,3- β -D-glucan polymer, which was higher in the mycelium phase.

In silico studies have also indicated that the *PbFks1* transcriptional level was higher in the *P. brasiliensis* *Pb01* yeast phase than in the mycelium phase (data not shown; <http://www.dna.biomol.unb.br/Pb>) and this result was confirmed by qRT-PCR in *Pb01*, showing an identical aspect described in the isolate IVIC *Pb73* (Sorais et al., 2009).

The isolation of transmembrane fungi proteins in the soluble form was very difficult since it required the use of detergents which generally yielded unstable preparations. For this reason, we expressed the probable catalytic domain of *PbFks1p* (*PbFks1pc*) and detected the activity of the protein. Thus, *PbFks1pc* is the first 1,3- β -D-glucan synthase recombinant protein with confirmed activity. Only one 1,3- β -D-glucan synthase recombinant has so far been obtained, but activity has not been demonstrated (Beauvais et al., 2001). In the enzymatic assay, the native protein incorporated more glucose than the recombinant protein probably due to the regulatory components present in the membrane fraction of the cell, which could regulate its activity positively. *PbFks1pc* acted as an immunogen in rabbit, enabling the production of anti-*PbFks1pc* antibody capable of recognizing *PbFks1p*.

Molecular analyses of the protein Fksp are scarce considering its essential importance to fungi like *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. neoformans*, *C. posadasii*, *A. fumigatus* (Beauvais et al., 2001; Kellner et al., 2005; Mazur et al., 1995; Mio et al., 1997; Thompson et al., 1999). Despite some attempts, advances in functional genomic studies of *P. brasiliensis* have been delayed by the absence of efficient classical genetic techniques and detailed information on the fungus life cycle, such as homologous recombination or haploid segregation (Almeida et al., 2007; Soares et al., 2005). Thus, studies of this molecule function are still not feasible in this microorganism. However, to better

understand the participation of *PbFks1p*, we decided to study its localization in the yeast and mycelial phases.

In fungi, the localization of 1,3- β -D-glucan synthase in the membrane has been described (Delom et al., 2006; reviewed by Latgé, 2007). Applying *P. brasiliensis* isolate IVIC *Pb73* (San-Blas and San-Blas, 1982), detected this enzyme in the membrane fraction of the mycelium and yeast phases. Here, we also show that *PbFks1p* from *Pb01* was present in the membrane fraction of both fungal phases. The expression of *PbFks1p* recognized by anti-*PbFks1p* antibody was almost three times higher in the yeast than in the mycelium phase. Confocal analysis showed that *PbFks1p* was localized in the apical growing region of mycelium. Similar results were found in *A. fumigatus* (Beauvais et al., 2001). In yeast cells, *PbFks1p* was uniformly observed by confocal-immunofluorescence on the surface of the cells, corroborating data obtained from Western blot experiments, which identified *PbFks1p* in both the membrane and in the cell wall. Chitin synthase, described as a transmembrane protein, was also located in the cell wall of *Ustilago maydis* (Ruiz-Herrera et al., 2006). Yet, some proteins normally considered to have cytoplasm or membrane localization have been found firmly bound to the glucan-chitin network in the cell wall (Pitarch et al., 2002). Studies in *S. cerevisiae* suggested that some GPI proteins, which were usually found attached to the membrane, were covalently linked to the polysaccharides of the wall and played an essential structural role in cell wall organization (reviewed by Latgé, 2007). The localization of *PbFks1p* in the cell surface is related to its role in the assimilation of soluble intracellular nucleotide sugars and in the extrusion of insoluble products into the cell wall space (Latgé, 2007).

Here we show that a larger amount of 1,3- β -D-glucan polymer is located in the mycelium phase than in the yeast phase, corroborating previous data concerning *Pb7193* (Kanetsuna et al., 1972). As was previously mentioned, this finding was in opposition to the transcript level of *PbFKS1* found in *Pb01* and IVIC *Pb73* (Sorais et al., 2009) and to the *PbFks1p* level of *Pb01*, which were greater in the yeast than in the mycelium phase. We have no data to explain this discrepancy, but we may conjecture the following: (a) Considerable biochemical and genetic evidence identifies the Rho1 GTPase as a regulator of 1,3- β -D-glucan synthase (Drogonova et al., 1996; Mazur and Baginsky, 1996; Qadota et al. 1996). This regulatory subunit was probably overexpressed in the mycelium phase of *Pb01*, as was seen by Sorais et al. (2009) in *Pb73* IVIC. Although 1,3- β -D-glucan synthase is well established as an Rho1 effector, the interaction domains between the catalytic and regulatory subunits of 1,3- β -D-glucan synthase and the basis for Rho1 activation in 1,3- β -D-glucan synthase catalytic subunits remain unknown (Lesage and Bussey, 2006). (b) These findings could also indicate a possible post-translational regulation of *PbFks1p* in *P. brasiliensis* isolates. This hypothesis is supported by several possible post-translation modification sites found in the predicted protein *PbFks1p* by *in silico* analysis (data not shown).

In conclusion, the complex mechanism of 1,3- β -D-glucan polymer synthesis in *P. brasiliensis* is still unknown because fungal cell wall biology is a complex and integrated process (Lesage and Bussey, 2006), where regulation mechanisms are expressed at multiple levels, such as in the cell cycle, cell polarity and isotropic/apical growth, adaptation to external conditions, the integrity of the PKC pathway, and other regulatory pathways. Rho1

is at the hub of many signaling pathways and acts as a signal integrator (Lesage and Bussey, 2006).

Acknowledgments

This work at Universidade Federal de Goiás was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and by the International Foundation for Sciences (IFS), Stockholm, Sweden, through a grant to M.P. P.K.T. was supported by a fellowship from CNPq.

References

- Almeida AJ, Carmona JA, Cunha C, Carvalho A, Rappleye CA, Goldman WE, Hooykaas PJ, Leao C, Ludovico P, Rodrigues F, 2007. Towards a molecular genetic system for the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* **44**(12): 1387-98.
- Arellano M, Duran A, Perez P, 1996. Rho 1 GTPase activates the (1-3)beta-D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. *Embo J* **15**(17): 4584-91.
- Bastos KP, Bailao AM, Borges CL, Faria FP, Felipe MS, Silva MG, Martins WS, Fiuza RB, Pereira M, Soares CM, 2007. The transcriptome analysis of early morphogenesis in

Paracoccidioides brasiliensis mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol* **7**: 29.

Beauvais A, Bruneau JM, Mol PC, Buitrago MJ, Legrand R, Latge JP, 2001. Glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. *J Bacteriol* **183**(7): 2273-9.

Beauvais A, Maubon D, Park S, Morelle W, Tanguy M, Huerre M, Perlin DS, Latge JP, 2005. Two α (1-3) glucan synthases with different functions in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* **71**(3): 1531-8.

Billon-Grand G, Marais MF, Joseleau JP, Girard V, Gay L, Fevre M, 1997. A novel 1,3- β -glucan synthase from the oomycete *Saprolegnia monoica*. *Microbiology* **143**:3175-3183.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**:248-54.

Brown GD, 2006. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* **6**(1): 33-43.

Carbonell LM, Kanetsuna F, Gil F, 1970. Chemical morphology of glucan and chitin in the cell wall of the yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* **101**(2): 636-42.

Castro NS, Barbosa MS, Maia ZA, Bao SN, Felipe MS, Santana JM, Soares Mendes-Giannini MJ, Pereira M, Soares CMA, 2008. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* PbDfg5p, a cell-wall protein implicated in filamentous growth. *Yeast* **25**(2): 141-54.

Castro NS, Castro KP, Orlandi I, Feitosa LS, Rosa e Silva LK, Vainstein MH, Bao SN, Vai M, Soares CM, 2009. Characterization and functional analysis of the beta-1,3-glucanosyltransferase 3 of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Yeast Res* **9**(1): 103-14.

da Silva Neto BR, de Fatima da Silva J, Mendes-Giannini MJ, Lenzi HL, de Almeida Soares CM, Pereira M, 2009. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. *BMC Microbiol* **9**: 272.

Delom F, Szponarski W, Sommerer N, Boyer JC, Bruneau JM, Rossignol M, Gibrat R, 2006. The plasma membrane proteome of *Saccharomyces cerevisiae* and its response to the antifungal calcofluor. *Proteomics* **6**(10): 3029-39.

Drgonová J, Drgon T, Tanaka K, Kollár R, Chen GC, Ford RA, Chan CS, Takai Y, Cabib E, 1996. Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science*. **272**:277-9.

Guest GM, Lin X, Momany M, 2004. *Aspergillus nidulans* RhoA is involved in polar growth, branching, and cell wall synthesis. *Fungal Genet Biol* **41**(1): 13-22.

Inoue SB, Qadota H, Arisawa M, Anraku Y, Watanabe T, Ohya Y, 1996. Signaling toward yeast 1,3-beta-glucan synthesis. *Cell Struct Funct*. **21**:395-402.

Inoue K, Takano H, Koike E, Yanagisawa R, Oda T, Tamura H, Adachi Y, Ishibashi K, Ohno N, 2009. Candida soluble cell wall beta-glucan facilitates ovalbumin-induced allergic airway inflammation in mice: Possible role of antigen-presenting cells. *Respir Res* **10**: 68.

Kanetsuna F, Carbonell LM, 1970. Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* **101**(3): 675-80.

Kanetsuna F, Carbonell LM, Azuma I, Yamamura Y, 1972. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* **110**(1): 208-18.

Kellner EM, Orsborn KI, Siegel EM, Mandel MA, Orbach MJ, Galgiani JN, 2005. *Coccidioides posadasii* contains a single 1,3-beta-glucan synthase gene that appears to be essential for growth. *Eukaryot Cell* **4**(1): 111-20.

Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-5.

Latge JP, 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* **66**(2): 279-90.

Lesage G, Bussey H, 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **70**:317-43.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**(4): 402-8.

Mazur P, Baginsky W, 1996. In vitro activity of 1,3-beta-D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *J Biol Chem.* **271**:14604-9.

Mazur P, Morin N, Baginsky W, el-Sherbeini M, Clemas JA, Nielsen JB, Foor F, 1995. Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol* **15**(10): 5671-81.

Mio T, Adachi-Shimizu M, Tachibana Y, Tabuchi H, Inoue SB, Yabe T, Yamada-Okabe T, Arisawa M, Watanabe T, Yamada-Okabe H, 1997. Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* GSC1/FKS1 and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol* **179**(13): 4096-105.

Pereira M, Felipe MS, Brigido MM, Soares CM, Azevedo MO, 2000. Molecular cloning and characterization of a glucan synthase gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast* **16**(5): 451-62.

- Pitarch A, Sanchez M, Nombela C, Gil C, 2002. Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol Cell Proteomics* **1**(12): 967-82.
- Qadota H, Python CP, Inoue SB, Arisawa M, Anraku Y, Zheng Y, Watanabe T, Levin DE, Ohya Y, 1996. Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science* **272**:279-81.
- Roh DH, Bowers B, Riezman H, Cabib E, 2002. Rho1p mutations specific for regulation of beta(1,3)glucan synthesis and the order of assembly of the yeast cell wall. *Mol Microbiol* **44**(5): 1167-83.
- Ruiz-Herrera J, Xoconostle-Cazares B, Reynaga-Pena CG, Leon-Ramirez C, Carabez-Trejo A, 2006. Immunolocalization of chitin synthases in the phytopathogenic dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *FEMS Yeast Res* **6**(7): 999-1009.
- Sambrook J, Russel DW, 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- San-Blas G, San-Blas F, 1982. Effect of detergents on membrane-associated glucan synthetase from *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* **152**(2): 563-6.

Silva SP, Felipe MSS, Pereira M, Azevedo MO, Soares CMA, 1994. Phase transition and stage-specific protein synthesis in the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exp Mycol* **18**: 294-299.

Soares RB, Velho TA, De Moraes LM, Azevedo MO, Soares CM, Felipe MS, 2005. Hygromycin B-resistance phenotype acquired in *Paracoccidioides brasiliensis* via plasmid DNA integration. *Med Mycol* **43**(8): 719-23.

Sorais F, Barreto L, Leal JA, Bernabe M, San-Blas G, Nino-Vega GA, 2010. Cell wall glucan synthases and GTPases in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* **46**: 35-47.

Thompson JR, Douglas CM, Li W, Jue CK, Pramanik B, Yuan X, Rude TH, Toffaletti DL, Perfect JR, Kurtz M, 1999. A glucan synthase FKS1 homolog in *Cryptococcus neoformans* is single copy and encodes an essential function. *J Bacteriol* **181**(2): 444-53.

Utsugi T, Minemura M, Hirata A, Abe M, Watanabe D, Ohya Y, 2002. Movement of yeast 1,3-beta-glucan synthase is essential for uniform cell wall synthesis. *Genes Cells* **7**:1-9.

Zambuzzi-Carvalho PF, Cruz AH, Santos-Silva LK, Goes AM, Soares CM, Pereira M, 2009. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 is required in the glyoxylate cycle and in the allantoin degradation pathway. *Med Mycol* **47**(7): 734-44.

Figure legends:

Figure 1. Analysis of the *PbFks1* transcript in mycelium and yeast cells. Total RNA was isolated from *Pb01* mycelium and yeast cells and qRT-PCR was performed. The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used to calculate the relative amount of specific RNA present in each sample. The *L34* gene was used to normalize each reaction. Bars indicate the SD of three independent experiments.

Figure 2. Expression and purification of recombinant protein *PbFks1pc* and antibody production. (A) SDS-PAGE analysis of *P. brasiliensis* recombinant *PbFks1pc*. *E. coli* cells harboring the pGEX 4-T3-*PbFks1c* plasmid before (lane 1) and after (lane 2) 1 h incubation with 0.5 mM IPTG. The fusion protein of 83 kDa was purified using an affinity matrix (lane 3) and cleaved with thrombin leading GST (26 kDa) and the recombinant protein (57 kDa) (lane 4). (B) Western blot analysis of *PbFks1pc* with the anti-*PbFks1pc* antibody. The samples of the recombinant fusion protein (B, lane 1) and of the cleaved protein (B, lane 2) were blotted onto a nylon membrane and detected using rabbit anti-*PbFks1pc* antibody (1:1000). Proteins were probed with preimmune rabbit (C).

Figure 3- Localization of *PbFks1p* in mycelium and yeast cells. (A) Western blot of protein fractions from *Pb01* mycelium and yeast cells. Samples from soluble fraction (lanes 1 and 4), cell wall-enriched fraction (lanes 2 and 5) and membrane fraction (lanes 3 and 6) were blotted onto a nylon membrane and detected by using rabbit anti-*PbFks1pc* antibody (1:500). Molecular size is indicated on right. (B) Relative amount of *PbFks1p* detected by

Western blot with anti-*PbFks1p* antibody in the membrane enriched fraction of mycelium and yeast cells.

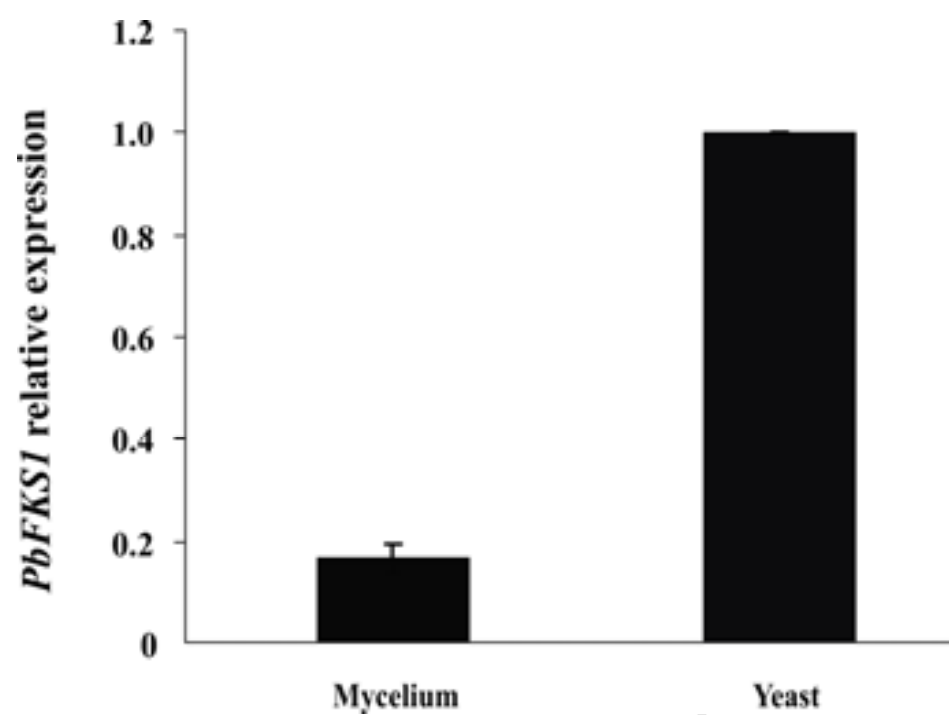
Figure 4- Cellular localization of *PbFks1p* by confocal microscopy. Confocal microscopy of *Pb01* mycelium and yeast cells showing the localization of *PbFks1p* in the apex of the hypha and in the surface of yeast cells.

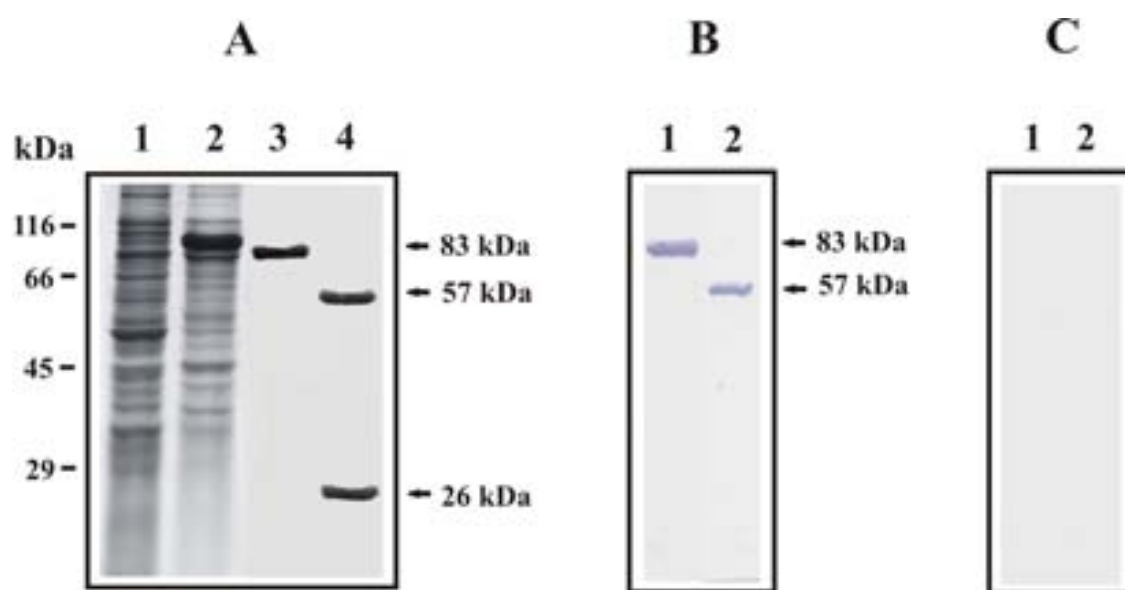
Figure 5- β -1,3-glucan content in the cell wall of *P. brasiliensis* mycelium and yeast cells. Relative content of β -1,3-glucan polymer in the alkali-insoluble (AI) and alkali-soluble (AS) fractions of the cell wall from mycelium (grey bars) and yeast (black bars) cells. The 1,3- β -D-glucan concentration was estimated as μ g equivalents of glucose. The data were normalized relative to the amount of β -1,3-glucan polymer in yeast cells. Bars indicate the SD of three independent experiments.

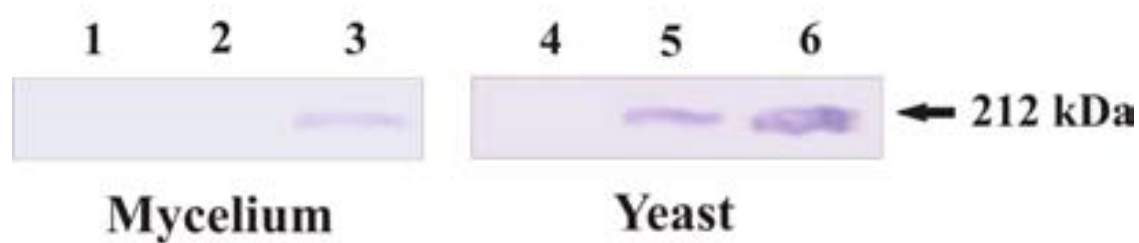
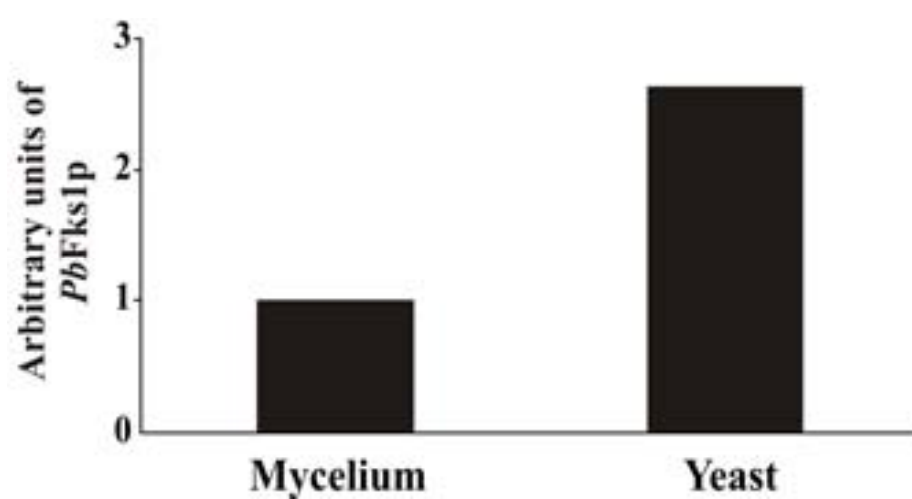
Table 1. Incorporation of glucose to 1,3- β -glucan.

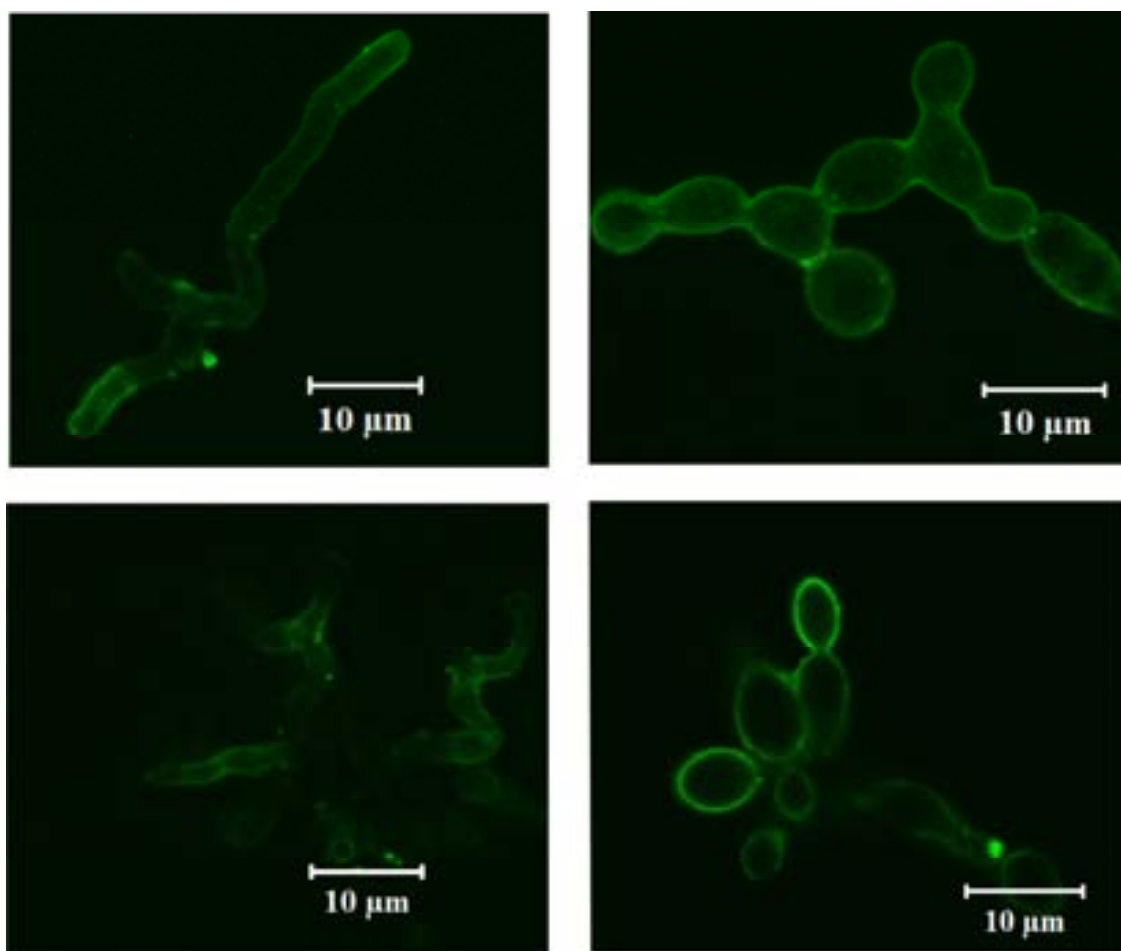
	<i>0 hour (cpm¹)</i>	<i>0 hour (nM²)</i>	<i>1 hour (cpm)</i>	<i>1 hour (nM)</i>
Membrane enriched fraction	3804	0.59×10^{-8}	15122	2.36×10^{-8}
<i>PbFks1pc</i>	3695	0.57×10^{-8}	8165	1.27×10^{-8}

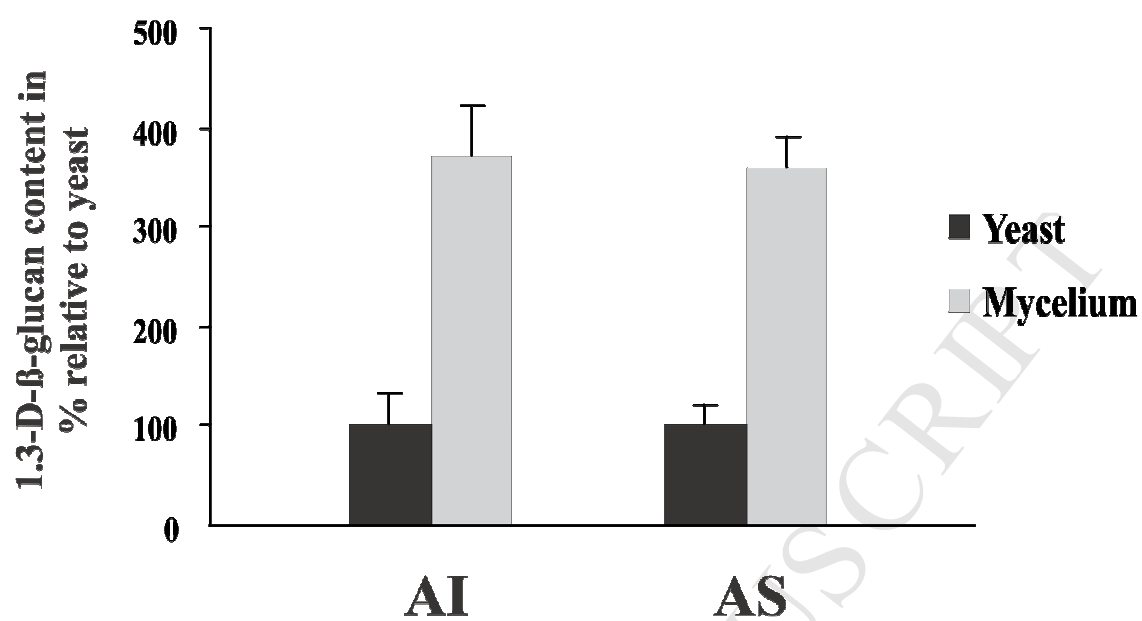
¹ counts per minute² concentration of [¹⁴C]glucose





A**B**

**Mycelium****Yeast**



Capítulo IV

**Considerações finais e
referências bibliográficas**

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* se mostraram sensíveis aos agentes estressores da parede celular CFW, CR, SDS, KCl, NaCl e sorbitol. O nível de transcrito de *PbFKS1* aumentou após o tratamento com todos os agentes estressores. Além disso, o conteúdo de carboidratos totais na fração AI, a qual contém o polímero de β -1,3-glicana, aumentou em todos os tratamentos acima, exceto com CR. Para confirmar o aumento específico do polímero de β -1,3-glicana após tratamento com os agentes estressores, o mesmo foi dosado após digestão da fração AI da parede celular com β -1,3-glicanase. Os resultados mostraram que o conteúdo de β -1,3-glicana aumentou em todos os tratamentos, inclusive com CR.

Dados obtidos por microscopia confocal mostraram que, após tratamento com todos os agentes estressores houve um espessamento da parede celular das células leveduriformes de *P. brasiliensis*. O fluoróforo CR se liga especificamente ao polímero de β -1,3-glicana. Estes dados mostram que, diante do estresse causado pelos agentes desestabilizadores da parede celular e agentes que causam estresse osmótico, dentre os mecanismos compensatórios ativados por *P. brasiliensis* ativa estão o espessamento da parede celular e maior deposição do polímero de β -1,3-glicana na fração AI.

Após tratamento com SDS e KCl houve aumento no nível do transcrito de *PbGFA1*, gene codificante da principal enzima da via de biossíntese de quitina, bem como no conteúdo de GlcNAc, monômeros de quitina. De forma contrária, após o tratamento com CFW e com sorbitol houve uma diminuição na expressão de *PbGFA1* e uma diminuição no conteúdo de GlcNAc. Estes dados mostram que a toda via de biossíntese de quitina está envolvida nos mecanismos compensatórios diante de danos

causadores de estresse na parede celular, seja por desestabilização da mesma ou por estresse osmótico.

PbGEL3 codifica para uma proteína com provável função de glicosiltransferase, sendo responsável pelo alongamento e ramificação do polímero de β -1,3-glicana. Diante do estresse causado por CFW, NaCl e sorbitol houve um aumento na expressão de *PbGEL3*. Este aumento foi acompanhado por um aumento no conteúdo do polímero de β -1,3-glucan e provavelmente contribuiu para a restauração da integridade da parede celular.

Em *P. brasiliensis*, após tratamento com os agentes perturbadores da parede celular houve uma dispersão na marcação de WGA-FITC, uma lecitina com afinidade por oligômeros de β -1,4-GlcNAc conjugada ao fluoróforo FITC, comparado com a condição controle. Nós sugerimos que sob condições de estresse a parede celular apresentou quitooligosacarídeos indicando a sínteses *de novo* do polímero de quitina principalmente na presença de SDS e KCl onde houve um aumento no conteúdo de resíduos de GlcNAc.

A enzima Fks é a subunidade catalítica que sintetiza o polímero de β -1,3-glicana. O nível relativo de transcrito de *PbFKS1* no isolado *Pb01* foi determinado nas fases miceliana e leveduriforme de *P. brasiliensis*. O maior nível de transcrito na fase leveduriforme corrobora com os dados de *Northern blot* obtidos anteriormente para o isolado *Pb73* IVIC.

A proteína recombinante *PbFks1pc* foi expressa em *E. coli* (BL21) em sua forma ativa, de acordo com experimentos de atividade enzimática, utilizando um substrato específico para Fks. O anticorpo policlonal anti-*PbFks1pc* foi produzido em camundongo. Este anticorpo reconheceu *PbFks1p* presente nos extratos de parede celular e de membrana celular de *P. brasiliensis* nas fases de micélio e levedura.

Experimentos de imunocitocalização utilizando anti-*PbFks1p* revelaram a presença de *PbFks1p* em regiões de crescimento apical no micélio e na superfície celular em células leveduriformes.

Além dos níveis de transcrito de *PbFKS1* aumentados na fase leveduriforme a quantidade de proteínas reconhecida por anti-*PbFks1p* em experimentos de *Western blot* também foi maior nesta fase. No entanto, a dosagem do conteúdo de β -1,3-glicana foi maior para a fase miceliana assim como observado para o isolado *Pb7193*. A provável subunidade regulatória do complexo de β -1,3-glicana sintase, *RHO1*, ao contrário de *FKS1* foi mais expressa na fase miceliana do que na fase leveduriforme em *Pb73* IVIC. Estes dados podem indicar uma possível regulação pós-traducional em *PbFks1p* em isolados de *P. brasiliensis*. Esta hipótese é respaldada por vários possíveis sítios de modificação pós-traducional encontrados na proteína predita *PbFks1p* em análises *in silico*.

II. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albornoz, M.C.B. (1971). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia** 9:248-53.
- Abe, M., Nishida, I., Minemura, M., Qadota, H., Seyama, Y., Watanabe, T. and Ohya, Y. (2001). Yeast 1,3-beta-glucan synthase activity is inhibited by phytosphingosine localized to the endoplasmic reticulum. **J Biol Chem** 276(29): 26923-30.
- Abe, M., Qadota, H., Hirata, A. and Ohya, Y. (2003). Lack of GTP-bound Rho1p in secretory vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Cell Biol** 162(1): 85-97.
- Almeida, A. J., Cunha, C., Carmona, J. A., Sampaio-Marques, B., Carvalho, A., Malavazi, I., Steensma, H. Y., Johnson, D. I., Leao, C., Logarinho, E., Goldman, G. H., Castro, A. G., Ludovico, P. and Rodrigues, F. (2009). Cdc42p controls yeast-cell shape and virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol** 46(12): 919-26.
- Anjos, R. A.; Calvi, S. A.; Ferracini, R.; Peraçoli, M. T. S.; Silva, C. L.; Soares, A. M. V. C. (2002). Role of *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall fraction containing β -1,3-glucan in tumor necrosis factor- α production by human monocytes: correlation with fungicidal activity. **Medical Mycology** 40:377-382.
- Arellano, M.; Duran, A.; Perez, P. (1996). Rho 1 GTPase activate the (1,3) β -D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. **EMBO J** 15(17):4585-4591.
- Bagagli, E., Franco, M., Bosco Sde, M., Hebelbarbosa, F., Trinca, L. A. and Montenegro, M. R. (2003). High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med Mycol** 41(3): 217-23.
- Bagagli, E., Theodoro, R. C., Bosco, S. M. and McEwen, J. G. (2008). *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia** 165(4-5): 197-207.
- Barret, D. (2002). From natural products to clinically useful antifungals. **Biochem. Bioph. Acta** 1587:224-233.
- Barreto, L., Sorais, F., Salazar, V., San-Blas, G. and Nino-Vega, G. A. (2009). Expression of *Paracoccidioides brasiliensis* CHS3 in a *Saccharomyces cerevisiae* chs3 null mutant demonstrates its functionality as a chitin synthase gene. **Yeast**.
- 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. and 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** 7: 29.

Beauvais, A., Bruneau, J. M., Mol, P. C., Buitrago, M. J., Legrand, R. and Latge, J. P. (2001). Glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. **J Bacteriol** 183(7): 2273-9.

Beauvais, A., Maubon, D., Park, S., Morelle, W., Tanguy, M., Huerre, M., Perlin, D. S. and Latge, J. P. (2005). Two α (1-3) glucan synthases with different functions in *Aspergillus fumigatus*. **Appl Environ Microbiol** 71(3): 1531-8.

Bermejo, C., Rodriguez, E., Garcia, R., Rodriguez-Pena, J. M., Rodriguez de la Concepcion, M. L., Rivas, C., Arias, P., Nombela, C., Posas, F. and Arroyo, J. (2008). The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. **Mol Biol Cell** 19(3): 1113-24.

Bialek, R., Ibricevic, A., Aepinus, C., Najvar, L. K., Fothergill, A. W., Knobloch, J. and Graybill, J. R. (2000). Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. **J Clin Microbiol** 38(8): 2940-2.

Borba, C.M. and Schäffer, G.M.V. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and an attempt to induce the dimorphic process with fetal calf serum. **Mycosis**. 45:174-179.

Borges-Walmsley, M. I., Chen, D., Shu, X. and Walmsley, A. R. (2002). The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol** 10(2): 80-7.

Brown, G. D., Herre, J., Williams, D. L., Willment, J. A., Marshall, A. S. and Gordon, S. (2003). Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. **J Exp Med** 197(9): 1119-24.

Brummer, E., Castaneda, E. and Restrepo, A. (1993). Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol Rev** 6(2): 89-117.

Bulik, D. A., Olczak, M., Lucero, H. A., Osmond, B. C., Robbins, P. W. and Specht, C. A. (2003). Chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* in response to supplementation of growth medium with glucosamine and cell wall stress. **Eukaryot Cell** 2(5): 886-900.

Cabib, E.; Drgonova, J.; Drgon, T. (1998). Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. **Annu. Rev. Biochem.** 67:307-333.

Cabib, E., Roh, D. H., Schmidt, M., Crotti, L. B. and Varma, A. (2001). The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. **J Biol Chem** 276(23): 19679-82.

Carbonell, L. M., Kanetsuna, F. and Gil, F. (1970). Chemical morphology of glucan and chitin in the cell wall of the yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol** 101(2): 636-42.

Carvalho, M. J., Amorim Jesuino, R. S., Daher, B. S., Silva-Pereira, I., Freitas, S. M., Soares, C. M. and Felipe, M. S. (2003). Functional and genetic characterization of calmodulin from the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol** 39(3): 204-10.

Castro N. S., de Castro, K. P., Orlandi, I., Feitosa Ldos, S., Rosa e Silva, L. K., Vainstein, M. H., Bao, S. N., Vai, M. and Soares, C. M. (2009). Characterization and functional analysis of the beta-1,3-glucanotransferase 3 of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **FEMS Yeast Res** 9(1): 103-14.

Corredor, G. G., Peralta, L. A., Castano, J. H., Zuluaga, J. S., Henao, B., Arango, M., Tabares, A. M., Matute, D. R., McEwen, J. G. and Restrepo, A. (2005). The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. **Med Mycol** 43(3): 275-80.

Cortes, J. C., Carnero, E., Ishiguro, J., Sanchez, Y., Duran, A. and Ribas, J. C. (2005). The novel fission yeast (1,3)beta-D-glucan synthase catalytic subunit Bgs4p is essential during both cytokinesis and polarized growth. **J Cell Sci** 118(Pt 1): 157-74.

Cortes, J. C., Ishiguro, J., Duran, A. and Ribas, J. C. (2002). Localization of the (1,3)beta-D-glucan synthase catalytic subunit homologue Bgs1p/Cps1p from fission yeast suggests that it is involved in septation, polarized growth, mating, spore wall formation and spore germination. **J Cell Sci** 115(Pt 21): 4081-96.

Cortes, J. C., Konomi, M., Martins, I. M., Munoz, J., Moreno, M. B., Osumi, M., Duran, A. and Ribas, J. C. (2007). The (1,3)beta-D-glucan synthase subunit Bgs1p is responsible for the fission yeast primary septum formation. **Mol Microbiol** 65(1): 201-17.

Costa, M., Borges, C. L., Bailao, A. M., Meirelles, G. V., Mendonca, Y. A., Dantas, S. F., de Faria, F. P., Felipe, M. S., Molinari-Madlum, E. E., Mendes-Giannini, M. J., Fiuza, R. B., Martins, W. S., Pereira, M. and Soares, C. M. (2007). Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. **Microbiology** 153(Pt 12): 4194-207.

Coutinho, Z. F., Silva, D., Lazera, M., Petri, V., Oliveira, R. M., Sabroza, P. C. and Wanke, B. (2002). Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saude Publica** 18(5): 1441-54.

Damveld, R. A., Arentshorst, M., Franken, A., vanKuyk, P. A., Klis, F. M., van den Hondel, C. A. and Ram, A. F. (2005a). The *Aspergillus niger* MADS-box transcription factor RlmA is required for cell wall reinforcement in response to cell wall stress. **Mol Microbiol** 58(1): 305-19.

Damveld, R. A., vanKuyk, P. A., Arentshorst, M., Klis, F. M., van den Hondel, C. A. and Ram, A. F. (2005b). Expression of agsA, one of five 1,3-alpha-D-glucan synthase-encoding genes in *Aspergillus niger*, is induced in response to cell wall stress. **Fungal Genet Biol** 42(2): 165-77.

Dávila, T., San-Blas, G and San-Blas, F. (1986). Effect of papulacandin B on glucan synthesis in *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.** 24:193-202.

de Nobel, H., Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M. and Klis, F. M. (2000). Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. **Microbiology** 146 (Pt 9): 2121-32.

Dijkgraaf, G. J., Abe, M., Ohya, Y. and Bussey, H. (2002). Mutations in Fks1p affect the cell wall content of beta-1,3- and beta-1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast** 19(8): 671-90.

Douglas, C. M. (2001). Fungal beta(1,3)-D-glucan synthesis. **Med Mycol** 39 Suppl 1: 55-66.

Felipe, M. S., Andrade, R. V., Arraes, F. B., Nicola, A. M., Maranhao, A. Q., Torres, F. A., Silva-Pereira, I., Pocas-Fonseca, M. J., Campos, E. G., Moraes, L. M., Andrade, P. A., Tavares, A. H., Silva, S. S., Kyaw, C. M., Souza, D. P., Pereira, M., Jesuino, R. S., Andrade, E. V., Parente, J. A., Oliveira, G. S., Barbosa, M. S., Martins, N. F., Fachin, A. L., Cardoso, R. S., Passos, G. A., Almeida, N. F., Walter, M. E., Soares, C. M., Carvalho, M. J. and Brigido, M. M. (2005). Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **J Biol Chem** 280(26): 24706-14.

Felipe, M. S., Andrade, R. V., Petrofeza, S. S., Maranhao, A. Q., Torres, F. A., Albuquerque, P., Arraes, F. B., Arruda, M., Azevedo, M. O., Baptista, A. J., Bataus, L. A., Borges, C. L., Campos, E. G., Cruz, M. R., Daher, B. S., Dantas, A., Ferreira, M. A., Ghil, G. V., Jesuino, R. S., Kyaw, C. M., Leitao, L., Martins, C. R., Moraes, L. M., Neves, E. O., Nicola, A. M., Alves, E. S., Parente, J. A., Pereira, M., Pocas-Fonseca, M. J., Resende, R., Ribeiro, B. M., Saldanha, R. R., Santos, S. C., Silva-Pereira, I., Silva, M. A., Silveira, E., Simoes, I. C., Soares, R. B., Souza, D. P., De-Souza, M. T., Andrade, E. V., Xavier, M. A., Veiga, H. P., Venancio, E. J., Carvalho, M. J., Oliveira, A. G., Inoue, M. K., Almeida, N. F., Walter, M. E., Soares, C. M. and Brigido, M. M. (2003). Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. **Yeast** 20(3): 263-71.

Fernandes, L., Araujo, M. A., Amaral, A., Reis, V. C., Martins, N. F. and Felipe, M. S. (2005). Cell signaling pathways in *Paracoccidioides brasiliensis*--inferred from comparisons with other fungi. **Genet Mol Res** 4(2): 216-31.

Franco, M. (1987). Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J Med Vet Mycol** 25(1): 5-18.

Fujioka, T., Mizutani, O., Furukawa, K., Sato, N., Yoshimi, A., Yamagata, Y., Nakajima, T. and Abe, K. (2007). MpkA-Dependent and -independent cell wall integrity signaling in *Aspergillus nidulans*. **Eukaryot Cell** 6(8): 1497-510.

Furtado, J. S., de Brito, T. and Freymuller, E. (1967). The structure and reproduction of *Paracoccidioides brasiliensis* in human tissue. **Sabouraudia** 5(3): 226-9.

- Garcia, P., Tajadura, V., Garcia, I. and Sanchez, Y. (2006). Role of Rho GTPases and Rho-GEFs in the regulation of cell shape and integrity in fission yeast. **Yeast** 23(13): 1031-43.
- Garcia, R., Bermejo, C., Grau, C., Perez, R., Rodriguez-Pena, J. M., Francois, J., Nombela, C. and Arroyo, J. (2004). The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. **J Biol Chem** 279(15): 15183-95.
- Georgopapadakou, N.H. (2002). Antifungals targeted to protein modification: focus on protein N-myristoyltransferase. **Expert Opinion Investigation Drugs** 11:1117-1125.
- Greer, D.L.; Bolaños, B. (1977). Role of bats in the ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: the survival of *Paracoccidioides brasiliensis* in the intestinal tract of frugivorous bat, *Artibeus lituratus*. **Sabouraudia** 15:273-82.
- Guest, G. M., Lin, X. and Momany, M. (2004). *Aspergillus nidulans* RhoA is involved in polar growth, branching, and cell wall synthesis. **Fungal Genet Biol** 41(1): 13-22.
- Henar Valdivieso, M., Duran, A. and Roncero, C. (1999). Chitin synthases in yeast and fungi. **Exs** 87: 55-69.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiol Mol Biol Rev** 66(2): 300-72.
- Inoue, S.B.; Takenaki, L.; Takasuoka, T.; Mio, T.; Adachi, M.; Fuji, Y.; Miyamoto, C.; Arisawa, M.; Furuichi, Y.; Watanabe, T. (1995). Characterization and gene cloning of 1,3- β -D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur J Biochem.** 321:845-854.
- Inoue, K., Takano, H., Koike, E., Yanagisawa, R., Oda, T., Tamura, H., Adachi, Y., Ishibashi, K. and Ohno, N. (2009). Candida soluble cell wall beta-glucan facilitates ovalbumin-induced allergic airway inflammation in mice: Possible role of antigen-presenting cells. **Respir Res** 10: 68.
- Ishihara, S., Hirata, A., Nogami, S., Beauvais, A., Latge, J. P. and Ohya, Y. (2007). Homologous subunits of 1,3-beta-glucan synthase are important for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryot Cell** 6(2): 143-56.
- Iwamoto, M. A., Fairclough, S. R., Rudge, S. A. and Engebrecht, J. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* Sps1p regulates trafficking of enzymes required for spore wall synthesis. **Eukaryot Cell** 4(3): 536-44.
- Jung, U. S., Sobering, A. K., Romeo, M. J. and Levin, D. E. (2002). Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. **Mol Microbiol** 46(3): 781-9.

- Kanetsuna, F., Carbonell, L. M., Azuma, I. and Yamamura, Y. (1972). Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol** 110(1): 208-18.
- Kanetsuna, F., Carbonell, L. M., Moreno, R. E. and Rodriguez, J. (1969). Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol** 97(3): 1036-41.
- Kapteyn, J. C., Ram, A. F., Groos, E. M., Kollar, R., Montijn, R. C., Van Den Ende, H., Llobell, A., Cabib, E. and Klis, F. M. (1997). Altered extent of cross-linking of β 1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall β 1,3-glucan content. **J Bacteriol** 179(20): 6279-84.
- Kellner, E. M., Orsborn, K. I., Siegel, E. M., Mandel, M. A., Orbach, M. J. and Galgiani, J. N. (2005). *Coccidioides posadasii* contains a single 1,3- β -glucan synthase gene that appears to be essential for growth. **Eukaryot Cell** 4(1): 111-20.
- Kelly, R.; Register, E.; Hsu, M.J.; Kurtz, M.; Nielsen, J. (1996). Isolation of a gene involved in 1,3- β -glucan synthesis in *Aspergillus nidulans* and purification of the corresponding protein. **J Bacteriol** 178(15):4381-4391.
- Klepser, M.E. (2003). Future candidates in the search for new antifungal agents. **Current treatment options in infectious diseases** 5:489-494.
- Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G. and Francois, J. (2006). Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. **Mol Microbiol** 61(5): 1147-66.
- Kurokawa, C. S., Sugizaki, M. F. and Peracoli, M. T. (1998). Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 40(3): 125-35.
- Lacaz C.S. (1994). *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G (Eds). *Paracoccidioidomycosis*, CRC Press, Boca Ratón 2:13-25.
- Lagorce, A., Hauser, N. C., Labourdette, D., Rodriguez, C., Martin-Yken, H., Arroyo, J., Hoheisel, J. D. and Francois, J. (2003). Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem** 278(22): 20345-57.
- Lagorce, A., Le Berre-Anton, V., Aguilar-Uscanga, B., Martin-Yken, H., Dagkessamanskaia, A. and Francois, J. (2002). Involvement of GFA1, which encodes glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase, in the activation of the chitin synthesis pathway in response to cell-wall defects in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur J Biochem** 269(6): 1697-707.
- Latge, J. P. (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Mol Microbiol** 66(2): 279-90.

Latge, J. P., Mouyna, I., Tekaia, F., Beauvais, A., Debeaupuis, J. P. and Nierman, W. (2005). Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. **Med Mycol** 43 Suppl 1: S15-22.

Leclerc, M. C., Philippe, H. and Gueho, E. (1994). Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. **J Med Vet Mycol** 32(5): 331-41.

Lesage, G. and Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev** 70(2): 317-43.

Levin, D. E. (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev** 69(2): 262-91.

Liu, J., Tang, X., Wang, H., Oliferenko, S. and Balasubramanian, M. K. (2002). The localization of the integral membrane protein Cps1p to the cell division site is dependent on the actomyosin ring and the septation-inducing network in *Schizosaccharomyces pombe*. **Mol Biol Cell** 13(3): 989-1000.

Madrid, M., Nunez, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Gacto, M. and Cansado, J. (2007). Stress-activated protein kinase-mediated down-regulation of the cell integrity pathway mitogen-activated protein kinase Pmk1p by protein phosphatases. **Mol Biol Cell** 18(11): 4405-19.

Martin, H., Rodriguez-Pachon, J. M., Ruiz, C., Nombela, C. and Molina, M. (2000). Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem** 275(2): 1511-9.

Martin, V., Garcia, B., Carnero, E., Duran, A. and Sanchez, Y. (2003). Bgs3p, a putative 1,3-beta-glucan synthase subunit, is required for cell wall assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. **Eukaryot Cell** 2(1): 159-69.

Masuoka, J. (2004). Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses, and experimental challenges. **Clin Microbiol Rev** 17(2): 281-310.

Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Nielsen, J. B. and Foor, F. (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. **Mol Cell Biol** 15(10): 5671-81.

Montenegro M.R.; Miyaji M.; Franco M.; Nishimura K.; Coelho K.I.; Horie Y.; Mendes R.P.; Sano A.; FUKUSHIMA K.; FECCHIO D. Isolation of fungi from Nature in Region of Botucatu, State of São Paulo, Brazil, an Endemic Area of Paracoccidioidomycosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**. v.91, p.665-70, 1996.

Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W. A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R. P. and Latge, J. P. (2000). Glycosylphosphatidylinositol-anchored

glucanosyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. **J Biol Chem** 275(20): 14882-9.

Muhlschlegel, F. A. and Fonzi, W. A. (1997). PHR2 of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression. **Mol Cell Biol** 17(10): 5960-7.

Munro, C. A. and Gow, N. A. (2001). Chitin synthesis in human pathogenic fungi. **Med Mycol** 39 Suppl 1: 41-53.

Nakai, T.; Uno, J.; Ikeda, F.; Tawara, S.; Nishimura, K. and Miyaji, M. (2003). In vitro antifungal activity of Micafungin (FK463) against dimorphic fungi: comparison of yeast-like and mycelial forms. **Antimicrob. Agents Chemother.** 47:1376-1381.

Nakamura, K., Kinjo, T., Saijo, S., Miyazato, A., Adachi, Y., Ohno, N., Fujita, J., Kaku, M., Iwakura, Y. and Kawakami, K. (2007). Dectin-1 is not required for the host defense to *Cryptococcus neoformans*. **Microbiol Immunol** 51(11): 1115-9.

Navarro-Garcia, F., Eisman, B., Fiuza, S. M., Nombela, C. and Pla, J. (2005). The MAP kinase Mkc1p is activated under different stress conditions in *Candida albicans*. **Microbiology** 151(Pt 8): 2737-49.

Negroni P. The *Paracoccidioides brasiliensis* lives saprophytically in the soil of Argentina. **Prensa Med Argent.**, v.53, n.39, p.2381-2, 1966.

Nemecek, J. C., Wuthrich, M. and Klein, B. S. (2006). Global control of dimorphism and virulence in fungi. **Science** 312(5773): 583-8.

Nino-Vega, G. A., Buurman, E. T., Gooday, G. W., San-Blas, G. and Gow, N. A. (1998). Molecular cloning and sequencing of a chitin synthase gene (CHS2) of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Yeast** 14(2): 181-7.

Nino-Vega, G. A., Carrero, L. and San-Blas, G. (2004). Isolation of the CHS4 gene of *Paracoccidioides brasiliensis* and its accommodation in a new class of chitin synthases. **Med Mycol** 42(1): 51-7.

Nino-Vega, G. A., Munro, C. A., San-Blas, G., Gooday, G. W. and Gow, N. A. (2000). Differential expression of chitin synthase genes during temperature-induced dimorphic transitions in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol** 38(1): 31-9.

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. and Goldman, G. H. (2005). Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. **Eukaryot Cell** 4(12): 2115-28.

Odds, F.C.; Brown, A.J.P.; Gow, N.A.R. (2003). Antifungal agents: mechanism of action. **Trends Microbiol.** 11(6):272-279.

- Olchoway, J., Gabriel, I. and Milewski, S. (2007). Functional domains and interdomain communication in *Candida albicans* glucosamine-6-phosphate synthase. **Biochem J** 404(1): 121-30.
- Paris, S., Duran-Gonzalez, S. and Mariat, F. (1985). Nutritional studies on *Paracoccidioides brasiliensis*: the role of organic sulfur in dimorphism. **Sabouraudia** 23(2): 85-92.
- Pereira, M., Felipe, M. S., Brigido, M. M., Soares, C. M. and Azevedo, M. O. (2000). Molecular cloning and characterization of a glucan synthase gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Yeast** 16(5): 451-62.
- Peterson, S.W.; Sigler, L. (1998). Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. **J Clin Microbiol.** 36:2918-25.
- Plaine, A., Walker, L., Da Costa, G., Mora-Montes, H. M., McKinnon, A., Gow, N. A., Gaillardin, C., Munro, C. A. and Richard, M. L. (2008). Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity. **Fungal Genet Biol** 45(10): 1404-14.
- Popolo, L., Gilardelli, D., Bonfante, P. and Vai, M. (1997). Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *ggp1delta* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol** 179(2): 463-9.
- Prado, M., da Silva, M. B., Laurenti, R., Travassos, L. R. and Taborda, C. P. (2009). Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 104(3): 513-21.
- Ragni, E., Coluccio, A., Rolli, E., Rodriguez-Pena, J. M., Colasante, G., Arroyo, J., Neiman, A. M. and Popolo, L. (2007). GAS2 and GAS4, a pair of developmentally regulated genes required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryot Cell** 6(2): 302-16.
- Ram, A. F., Arentshorst, M., Damveld, R. A., vanKuyk, P. A., Klis, F. M. and van den Hondel, C. A. (2004). The cell wall stress response in *Aspergillus niger* involves increased expression of the glutamine : fructose-6-phosphate amidotransferase-encoding gene (*gfaA*) and increased deposition of chitin in the cell wall. **Microbiology** 150(Pt 10): 3315-26.
- Ram, A. F., Wolters, A., Ten Hoopen, R. and Klis, F. M. (1994). A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. **Yeast** 10(8): 1019-30.
- Reese, A. J., Yoneda, A., Breger, J. A., Beauvais, A., Liu, H., Griffith, C. L., Bose, I., Kim, M. J., Skau, C., Yang, S., Sefko, J. A., Osumi, M., Latge, J. P., Mylonakis, E. and

- Doering, T. L. (2007). Loss of cell wall α (1-3) glucan affects *Cryptococcus neoformans* from ultrastructure to virulence. **Mol Microbiol** 63(5): 1385-98.
- Rementería, A.; Abaitua, F.; Garcia-Tobalina, R.; Hernando, F.; Pontón, J.; Sevilla, M.J. (1997). Resistance to candidiasis and macrophage activity in chitin-treated mice. FEMS Immunol. **Med Microbiol.** 19:223-230.
- Restrepo, A.; Salazar, M.E.; Cano, L.E.; Stover, E.P.; Feldman, D.; Stevens, D.A. (1984). Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect Immun.** 46:346-53.
- Restrepo, A. (1985). The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia** 23(5): 323-34.
- Restrepo, A., McEwen, J. G. and Castaneda, E. (2001). The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med Mycol** 39(3): 233-41.
- Restrepo-Moreno A. (1993). Paracoccidioidomycosis In: Murphy JW, Friedman H, Berdinelli M (Eds). Fungal Infections and Immune Responses Plenum Press. New York, NY, USA, p. 251-76.
- Ricci, G.; Mota, F.T.; Wakamatsu, A.; Serafim, R.C.; Borra, R.C.; Franco, M. (2004). Canine paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.** 42:379-383.
- Richini-Pereira, V. B., Bosco Sde, M., Griesse, J., Theodoro, R. C., Macoris, S. A., da Silva, R. J., Barrozo, L., Tavares, P. M., Zancope-Oliveira, R. M. and Bagagli, E. (2008). Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. **Med Mycol** 46(1): 35-40.
- Rivitti, E.A.; Aoki, V. (1999). Deep fungal infections in tropical countries. **Clin Dermatol.** 17:171-190.
- Rodriguez-Pena, J. M., Cid, V. J., Arroyo, J. and Nombela, C. (2000). A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. **Mol Cell Biol** 20(9): 3245-55.
- Roh, D.H.; Bowers, B.; Riezman, H.; Cabin, E. (2002). Rho1p mutations specific for regulation of β (1-3)glucan synthesis and the order of assembly of the yeast cell wall. **Mol Microbiol.** 44(5):1167-1183.
- San-Blas, G. (1979). Biosynthesis of glucans by subcellular fractions of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Experimental Mycology** 3:249-258.
- San-Blas, G. (1982). The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationships. **Mycopathologia** 79(3): 159-84.
- San-Blas, G. (1993). Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Med Vet Mycol** 31(2): 99-113.

San-Blas, G. and Nino-Vega, G. (2008). *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. **Mycopathologia** 165(4-5): 183-95.

San-Blas, G., Nino-Vega, G. and Iturriaga, T. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol** 40(3): 225-42.

San-Blas, G. and San-Blas, F. (1982). Effect of detergents on membrane-associated glucan synthetase from *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol** 152(2): 563-6.

Sekiya-Kawasaki, M., Abe, M., Saka, A., Watanabe, D., Kono, K., Minemura-Asakawa, M., Ishihara, S., Watanabe, T. and Ohya, Y. (2002). Dissection of upstream regulatory components of the Rho1p effector, 1,3-beta-glucan synthase, in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** 162(2): 663-76.

Silva, M.F.; Bocca, A.L.; Ferracini, R.JR.; Figueiredo, F.; Silva, C.L. (1997). Cellular requirements for immunomodulatory effects caused by cell wall components of *Paracoccidioides brasiliensis* on antibody production. **Clin Exp Immunol**. 109:261-71.

Silva, S. P., Felipe, M. S. S., Pereira, M., Azevedo, M. O. and Soares, C. M. A. (1994). Phase transition and stage-specific protein synthesis in the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Exp Mycol** 18: 294-299.

Sorais, F., Barreto, L., Leal, J. A., Bernabe, M., San-Blas, G. and Nino-Vega, G. A. (2009). Cell wall glucan synthases and GTPases in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**: 1-13.

Suzuki, K.; Okawa, Y.; Hashimoto, K.; Suzuki, S.; Suzuki, M. (1984). Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis. **Microbiol. Immunol**. 28:903-912.

Terashima, H., Yabuki, N., Arisawa, M., Hamada, K. and Kitada, K. (2000). Up-regulation of genes encoding glycosylphosphatidylinositol (GPI)-attached proteins in response to cell wall damage caused by disruption of FKS1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Gen Genet** 264(1-2): 64-74.

Thompson, J. R., Douglas, C. M., Li, W., Jue, C. K., Pramanik, B., Yuan, X., Rude, T. H., Toffaletti, D. L., Perfect, J. R. and Kurtz, M. (1999). A glucan synthase FKS1 homolog in *Cryptococcus neoformans* is single copy and encodes an essential function. **J Bacteriol** 181(2): 444-53.

Tomazett, P. K., Cruz, A. H., Bonfim, S. M., Soares, C. M. and Pereira, M. (2005). The cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*: insights from its transcriptome. **Genet Mol Res** 4(2): 309-25.

Utsugi, T., Minemura, M., Hirata, A., Abe, M., Watanabe, D. and Ohya, Y. (2002). Movement of yeast 1,3-beta-glucan synthase is essential for uniform cell wall synthesis. **Genes Cells** 7(1): 1-9.

Wanke, B, Londero, A.T. (1994). Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection, In Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. **CRC Press** 109-130.

Watzele, G. and Tanner, W. (1989). Cloning of the glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase gene from yeast. Pheromonal regulation of its transcription. **J Biol Chem** 264(15): 8753-8.

Zhao, C., Jung, U. S., Garrett-Engele, P., Roe, T., Cyert, M. S. and Levin, D. E. (1998). Temperature-induced expression of yeast FKS2 is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. **Mol Cell Biol** 18(2): 1013-22.