

Cátia Amancio Almeida

# Identificação de Ácidos Siálicos e Peptidases Secretadas em *Mucor* spp.



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Microbiologia).

Orientadoras: Prof<sup>ª</sup>. Celuta Sales Alviano  
Dr<sup>ª</sup>. Daniela Sales Alviano

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Almeida, Cátia Amancio

Identificação de ácidos siálicos e peptidases secretadas em *Mucor* spp./  
Cátia Amâncio Almeida. – Rio de Janeiro: UFRJ/ IMPPG, 2007.

xii, 97f.: il.; 29,7 cm.

Orientadoras: Celuta Sales Alviano e Daniela Sales Alviano

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de  
Góes/ Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), 2007.

Referências Bibliográficas: f. 86-97.

1. *Mucor* spp. 2. Ácidos siálicos. 3. Peptidases extracelulares. 4.  
Lectinas. 5. Interação. I Alviano, Celuta Sales e Alviano, Daniela Sales. II.  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo  
de Góes, Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia).

III. Título

---

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Cátia Amancio Almeida

### **Identificação de ácidos siálicos e peptidases secretadas em *Mucor* spp.**

Rio de Janeiro, 28 de fevereiro de 2007

---

**(Celuta Sales Alviano, Dr<sup>a</sup> em Ciências – Microbiologia,  
Universidade Federal do Rio de Janeiro)**

---

**(Daniela Sales Alviano, Dr<sup>a</sup> em Ciências – Microbiologia,  
Universidade Federal do Rio de Janeiro)**

---

**(Márcio Lourenço Rodrigues, Dr em Ciências – Microbiologia,  
Universidade Federal do Rio de Janeiro)**

---

**André Luís Souza dos Santos, Dr em Ciências – Microbiologia,  
Universidade Federal do Rio de Janeiro)**

---

**Lucimar Ferreira Kneipp, Dr<sup>a</sup> em Ciências – Microbiologia,  
Universidade Federal do Rio de Janeiro)**

---

**Sonia Rozental, Dr<sup>a</sup> em Ciências – Biofísica,  
Universidade Federal do Rio de Janeiro)**

Trabalho realizado no Laboratório de Estruturas de Superfície de Microrganismos do Departamento de Microbiologia Geral do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, sob a orientação da Dr<sup>a</sup>. Celuta Sales Alviano e da Dr<sup>a</sup> Daniela Sales Alviano.

**Dedicatória**

À minha maravilhosa mãe. O pouco que hoje sou como pessoa, devo essencialmente a você. Quando a vida me mostra obstáculos, aprendi com você (não só com palavras, mas acima de tudo, através de exemplos), que para aquele que possui força de vontade e acredita que o DIVINO “olha” por nós nada é impossível. Se pudesse voltar no tempo diria claramente o quanto lhe amo pessoalmente, mas acredito que, um dia, ainda terei essa oportunidade. Enquanto isso, seguimos jornadas paralelas mas sempre juntas!!! Só pensando dessa forma consigo continuar serenamente a minha jornada. Saudades.....

---

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente, às minhas orientadoras Celuta Sales Alviano e Daniela Sales Alviano, pela oportunidade de poder trabalhar num ambiente tão familiar e de, literalmente, me sentir em casa. Sinto-me feliz pela confiança e incentivo que vocês me dão. Muito Obrigada !!!!

Ao pessoal do laboratório: Fatinha, Luiz “Sambarilove”, Lucimar (para mim, você sempre será nossa !!!), Gleiser, Ana Cristina, Davi, Juliana, Danielle e minha grande amiga e cumadre Vanilla. Pelo estreito convívio, aproveito aqui para estender meu agradecimento ao pessoal do lab. 051: prof<sup>a</sup> Rosângela, Maristela (muito obrigada pelo imenso carinho e disposição, você é um anjo!!!), Glauce, Karina, Bianca e Madeleine. Agradeço também a vocês pelos momentos felizes e pela cooperação.

Aos professores Márcio, André e Leonardo. No dia-a-dia é difícil demonstrar o carinho e admiração mas, neste momento eu estou no direito de fazer minhas as palavras da prof<sup>a</sup> Eliana: “Vocês são os meninos de ouro deste Instituto”, o exemplo de sucesso no que fazem, com certeza vocês são referência pra mim. Não esquecendo das primeiras “crias” do trio: Fabiane, Bianca, Mariana, Fernanda (André), Fernanda (Márcio) e Camila.

À minha irmã (a gente briga, mas a gente se ama!) e a todos os meus amigos. Muitos devem estar chateados porque eu literalmente “sumi do mapa”, mas espero que depois desse sumiço todos (não são muitos mas são especiais !!!) me aceitem de volta. Muitos irão compreender, porque já diziam que eu moro no Fundão! A verdade é que só quem vive no mundo da pesquisa e, é literalmente picado por este bichinho do eterno questionamento, é que entende a nossa abdicação dos momentos felizes de lazer no convívio de quem a gente gosta.

Ao corpo docente do IMPPG, pelos preciosos ensinamentos sobre o “Mundo Microscópico”.

À Associação Vencer por ter acreditado em mim, e por ter dado suporte financeiro para que pudesse ter chances reais de disputar uma vaga em um curso superior. Serei eternamente grata a vocês !!!

Ao financiamento concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Enfim, agradeço também a outras pessoas (não quero ser injusta!), que apesar de não citadas contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

## RESUMO

No presente trabalho, os ácidos siálicos da superfície de diferentes isolados do gênero *Mucor* foram extraídos, purificados e caracterizados por cromatografia em camada fina de alta resolução (HPTLC) e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), além de quantificados por dosagem colorimétrica. Com a utilização dessas técnicas foi detectado o ácido *N*-acetilneuramínico em diferentes proporções em 8 das 11 amostras analisadas.

A localização dos ácidos siálicos na superfície foi avaliada através da utilização de lectinas conjugadas a isotiocianato de fluoresceína (FITC) e, através desta metodologia obteve-se nas formas de conídio e levedura de *M. polymorphosporus* marcações para LPA, SNA e MAA. A forma miceliana foi avaliada ainda quanto à presença de sialoglicoconjugados, exibindo marcação tanto em SNA quanto em MAA. Além desses achados, foi possível verificar a influência destes açúcares ácidos no que diz respeito à contribuição para carga negativa às superfícies fúngicas e, o possível escape dos mecanismos inatos do sistema imune do hospedeiro, através da adesão de conídios e leveduras ao substrato de poli-L-lisina e interação de conídios de *M. polymorphosporus* com monócitos e neutrófilos humanos, respectivamente. Quanto à avaliação da atividade peptidásica, os ensaios realizados demonstram que nas formas de micélio e levedura observa-se uma ampla faixa de atividade de hidrólise do BSA, no que diz respeito ao pH, com picos de atividade em pH 4 em ambas as formas, além de um pico adicional em pH 8 na forma de levedura. Estas atividades puderam ser totalmente inibidas por pepstatina A, em ambos os pHs, sendo que a atividade em pH 8,0 pode ser inibida por Iodoacetamida e TLCK, mas não por E-64, sugerindo a presença de aspártico em pH 4,0 (ScM e ScL) e cisteína-peptidases ou serina-peptidases em pH 8,0 (ScL). Adicionalmente, foi observada a capacidade do ScM em clivar substratos como laminina, HSA e mucina, demonstrando assim a ampla especificidade da(s) referida(s) peptidase(s). A identificação do ácido siálico, bem como peptidases extracelulares em *Mucor* spp. podem vir a contribuir para o melhor entendimento das interações entre o hospedeiro e este patógeno emergente.

## SUMMARY

In the present study, cell surface sialic acids from different species of *Mucor* spp. were isolated, purified and characterized by high performance thin layer chromatography (HPTLC), combined gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and quantified by colorimetric analysis. Using these techniques, different amounts of *N*-acetylneuraminic acid were identified in 8 of 11 studied strains. The conidia and yeast forms of *M. polymorphosporus* surface location of sialic acids was evaluated by fluorescein isothiocyanate-labelled (FITC) lectins binding assays with LPA, MAA and SNA, where conidial cells reacted more intensively with SNA, while yeast forms were more recognized by MAA. The occurrence of sialoglycoconjugates was evaluated in mycelia protein extract, which reacted with SNA and MAA. In addition it was possible to verify the influence of these acidic sugars on the negative cellular charge and on the host innate immune response mechanism, through the fungal adhesion to the cationic substrate poly-L-lisine and the phagocytosis assay of *M. polymorphosporus* conidia by human monocytes and neutrophils, respectively. Considering the peptidase activity evaluation, both mycelia and yeasts assays demonstrated a broad proteolytic activity using BSA as substrate, which were more active in pH 4.0 for both fungal forms and additionally active in pH 8.0 only for yeast forms. These extracellular peptidases were fully inhibited by pepstatin A in both pHs, however, the pH 8.0 activity was also inhibited by iodoacetamide and TLCK, but was not inhibited by E-64, suggesting the presence of aspartic peptidases in pH 4.0 (ScM e ScL) and cysteine or serine peptidases in pH 8.0 (ScL). In addition, mycelia culture supernatant was able to cleave a wide range of proteinaceous substrates as laminin, HSA and mucin, which demonstrates the broad specificity of these peptidases. The identification of sialic acids, as well as of the extracellular peptidases in *Mucor* spp. may contribute to a better understanding of the host-fungal interaction.

---

## ABREVIATURAS

BSTFA – bis(trimetilsilil)trifluoracetamida

CMP – citidina mono fosfato

FITC – isotiocianato de fluoresceína

GC-MS – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

HPTLC – cromatografia em camada fina de alta resolução

Kdn9P – ácido 2-ceto-3-deóxi-9-O-acetilneuramínico

Neu5,9Ac<sub>2</sub> – ácido 5-N-acetil-9-O-acetilneuramínico

Neu5Ac – ácido 5-N-acetilneuramínico

Neu5Ac9P – ácido 5-N-acetil-9-O-acetilneuramínico-9-fosfato

Neu5Gc – ácido 5-N-glicolilneuramínico

PBS – tampão fosfato de sódio

R<sub>f</sub> – distância relativa percorrida pelo composto

Rpm – rotações/minuto

UDP – uridina difosfato

GMSF - fator estimulante de granulócitos-macrófagos

IFN-  $\gamma$  - interferon gamma

PMSF - fluoreto de fenilmetanosulfonil

, EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EGTA – ácido etilenoglicoltetracético

E-64 - L-*trans*-epoxisuccinil leucilamido-(4-guanidino) butano

BCECF/AM - ester acetoximetil 2',7'-bis-(carboxietil)-5(6')-carboxifluoresceína

BCECF – 2',7'-bis-(carboxietil)-5(6')-carboxifluoresceína

BSA – soro albumina bovina

TLCK – tosil-lisil-clorometil cetona

## ÍNDICE

1 - Introdução.....	14
1.1- Os zigomicetos e a zigomicose.....	15
1.2 - Tratamento das zigomicoses.....	20
1.3 - Parede celular fúngica.....	20
1.4 - Parede celular dos zigomicetos.....	23
	25
1.5 - Ácidos siálicos.....	
1.6 – Determinação de ácidos siálicos.....	27
1.7 - Ácidos siálicos em fungos.....	27
1.8 - Enzimas proteolíticas.....	30
1.8.1 - Peptidases em fungos.....	35
1.8.2 - Enzimas Proteolíticas no gênero <i>Mucor</i> .....	38
2 - Objetivos.....	42
2.1 – Objetivo Geral.....	42
2.2 – Objetivos Específicos.....	42
3 - Material e Métodos.....	44
3.1 - Fungos.....	44
3.1.1 – Condições de cultivo.....	45
3.1.2 – Obtenção das formas de levedura em <i>M. polymorphosporus</i> .....	46
3.2 - Extração e purificação de ácidos siálicos.....	46
3.3 - Identificação de ácidos siálicos por HPTLC.....	47
3.4 - Análise de ácidos siálicos por GC-MS.....	47
3.5 - Quantificação de ácidos siálicos por dosagem química.....	48
3.6 - Interação com lectinas.....	48
3.6.1 - Evidenciação por microscopia de fluorescência.....	49
3.6.2 - Evidenciação por citometria de fluxo.....	49
3.7 - Análise de sialoglicoproteínas por Western Blotting.....	50
3.8 - Adesão à Poli-L-lisina.....	51
3.9 – Influência de ácidos siálicos na interação dos conídios de <i>M. polymorphosporus</i> com monócitos e neutrófilos humanos .....	52
3.10 – Determinação de atividade peptidásica secretada nas diferentes formas de <i>M. polymorphosporus</i> .....	53
3.10.1 - Efeito do pH na atividade peptidásica .....	53
3.10.2 - Atividade peptidásica de ScM frente a diferentes substratos protéicos.....	53
3.10.3 - Efeito de inibidores proteolíticos na atividade peptidásica.....	54
3.10.4 - Análise dos fragmentos de hidrólise enzimática dos substratos proteicos por SDS-PAGE.....	55
3.10.5 - Dosagem química da atividade peptidásica secretada nas diferentes formas de <i>M. polymorphosporus</i> .....	55
3.10.6 – Análise estatística.....	56
4 – Resultados.....	58
5 - Discussão.....	72
6 - Conclusões.....	84
7 - Referências bibliográficas.....	86

# INTRODUÇÃO

## **1 - INTRODUÇÃO**

Atualmente, a micologia médica tem despertado maior interesse na comunidade científica. As micoses ocasionadas principalmente pelos fungos oportunistas, têm se tornado cada vez mais freqüentes, como reflexo do crescente número de indivíduos imunocomprometidos, com destaque os portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), constituindo-se como um tema relevante para diversas áreas de especialidades médicas (LATGÉ & CALDERONE, 2002). Soma-se a isto o fato que, está generalizado cada vez mais o uso de inúmeros medicamentos imunossupressores para o tratamento e o controle de uma ampla variedade de doenças crônicas, neoplásicas e imunológicas; o que também favorece o estabelecimento e o desenvolvimento das infecções por fungos. Por conseguinte, os conceitos clássicos de infecções micóticas primárias e o de infecções micóticas oportunistas devem ser questionados quando se pretende diagnosticar uma micose (DELGADO & AGUIRRE, 1997; VAN-BURICK & MAGEE, 2001). Atualmente, existem dois fenômenos que acontecem simultaneamente: um se refere à modificação do espectro clínico dos oportunistas “clássicos”, e outro à emergência de novas espécies oportunistas, incomuns, e que não devem mais ser consideradas pelos profissionais de microbiologia como “contaminantes inofensivos”. Desta forma, a micologia vem sendo o campo de ação de vários pólos de pesquisa e de interesse científico, os quais estão sendo apoiados por diversas áreas de conhecimento (VAN-BURICK & MAGEE, 2001).

## 1.1 - OS ZIGOMICETOS E A ZIGOMICOSE

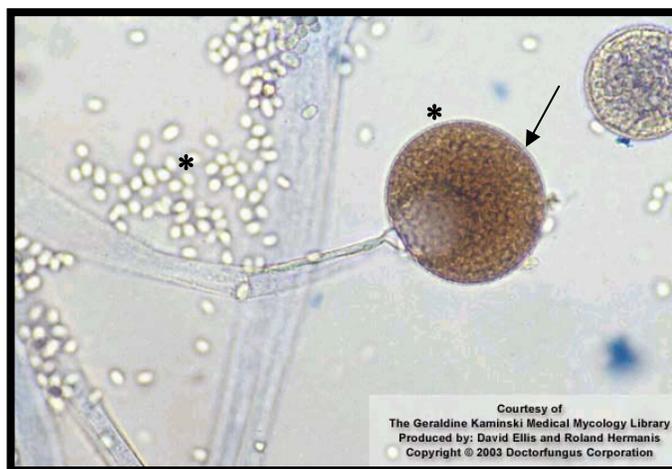
Os zigomicetos constituem uma classe de fungos, geralmente saprófitas, presentes no solo e em detritos vegetais. Desde 1800, já existiam relatos de representantes dessa classe causando doenças em humanos, apontando a espécie *Absidia corymbifera*, pertencente à ordem Mucorales, como a responsável por ocasionar a zigomicose disseminada em um paciente acometido por câncer (PLATAUF, 1885). A outra ordem que integra esta classe é a Entomophthorales, também implicada em micoses humanas, contudo as suas manifestações encontram-se mais associadas com lesões restritas às mucosas e tecidos subcutâneos, com melhor prognóstico (RIBES, VANOVER-SAMS & BAKER, 2000).

O gênero *Mucor* foi criado por Micheli & Saint Amans, em 1821 (SIDRIM & MOREIRA, 1999). Membro da família Mucoraceae seus principais representantes são: *M. amphibiorum*, *M. circinelloides*, *M. hiemalis*, *M. indicus*, *M. racemosus* e *M. ramosissimus* (RIBES, VANOVER-SAMS & BAKER, 2000). A maioria dos zigomicetos que possui importância clínica ou industrial pertence à ordem Mucorales. Outros representantes principais são os gêneros *Rhizopus* e *Absidia* (LEHER *et al.*, 1980; RIBES, VANOVER-SAMS, & BAKER, 2000).

Estes fungos apresentam grande distribuição no ambiente, são encontrados no ar e em alimentos, podem constituir a flora transitória da pele e mucosas do homem e de algumas espécies animais, e alguns deles, também podem ser fitopatogênicos (BHADURI *et al.*, 1983).

*Mucor* spp. têm crescimento muito rápido, inclusive em temperaturas maiores que 37°C, apresentando um período de maturação por volta do segundo ao quarto dia de semeadura, em vários meios de rotina laboratorial. Quanto ao aspecto

macromorfológico, possuem colônias com uma textura “algodonosa” alta e exuberante, com tonalidade branca ou amarelada, nos primeiros dias, tornando-se cinza ou castanha, durante o período de maturação dos esporângios. Quanto à micromorfologia, são fungos filamentosos constituídos de hifas de aspecto hialino, largas e irregulares, com presença irregular de septos (hifas pauciseptadas) e com ramificações em ângulo próximo de 90°. No ápice dos esporangióforos é possível observar esporângios de formato esférico apresentando em seu interior grande quantidade de esporangiosporos (Figura 1).



**Figura 1:** Morfologia microscópica de *Mucor* spp. Esporângio (seta) e esporos (asterisco).

Estes fungos geralmente, apresentam dimorfismo, ou seja, podem crescer em forma de hifa ou levedura, conforme as condições de cultivo (ORLOWSKI, 1991; ALLER *et al.*, 1997). Contudo, nem todas as espécies apresentam esta característica, algumas crescem somente em forma de hifa, sendo esta a morfologia que se encontra associada aos tecidos lesionados (ORLOWSKI, 1991). Os primeiros estudos relacionados ao dimorfismo relatavam que para obtenção do crescimento de *Mucor* sp na forma de

---

levedura, seria necessário uma atmosfera de alta pressão de dióxido de carbono e nitrogênio molecular. Contudo, Bartinicki-Garcia (1968) demonstrou que a questão do dimorfismo neste gênero é, essencialmente dependente de uma fonte de hexose, bem como da sua concentração. Além disso, foi observado que os parâmetros essenciais para este fenômeno não se comportam uniformemente dentre as espécies estudadas, havendo diferenças inclusive entre cepas de uma mesma espécie. Devido a esta problemática na obtenção destas formas fúngicas é creditado apenas ao micélio como sendo a forma infectiva (ORLOWSKI, 1991). Apesar disso, já foram encontradas leveduras da ordem Mucorales em material clínico, indicando que estas formas de crescimento podem ocorrer *in vivo* (COOPER, 1987).

Como mencionado anteriormente, estes fungos estão amplamente distribuídos no meio ambiente e, de uma forma geral, existem como saprófitas em frutas e pães. Esporos destas espécies têm sido observados em vários alimentos (ABDEL-HAFEZ, 1984). Todavia, os Mucorales podem atuar como parasitas, especialmente por causarem doenças em animais e humanos. Seus esporos são considerados pequenos (média de 6.6  $\mu\text{m}$ ), o que favorece a disseminação no meio ambiente e deposição no espaço alveolar. É crescente número de relatos destas espécies como contaminantes de instrumentos médicos e materiais para análises clínicas (RIBES, VANOVER-SAMS, & BAKER, 2000; CHAYAKULKEEREE, GHANNOUN & PERFECT, 2006).

Estes microrganismos são considerados patógenos oportunistas, pois a infecção causada pelos mesmos é extremamente rara em hospedeiros saudáveis, sugerindo que a patogenicidade destes fungos é observada principalmente quando um aspecto específico da defesa do hospedeiro sofre alguma alteração (HOGAN, KLEIN & LEVITZ, 1996; CHAYAKULKEEREE, GHANNOUN & PERFECT, 2006), tal como se observa em

---

casos de leucemia (ALLER *et al.*, 1997; PANDIT & RAHEMM, 2003), anemia aplástica (WEITZMAN *et al.*, 1993), transplantes de órgãos ou medula óssea (FISHER, TUAZON & GEELHOED, 1980), diabetes mellitus (VIRALLY *et al.*, 2002), doença renal (FERGI *et al.*, 1992), hemocromatose (MAcDONALD *et al.*, 1994), asma (ZABEL, 1997), câncer gástrico (DOUVIN, LETICHOUX & HUGUET, 1975), queimaduras (ZABEL, 1997), uso de deferoxamina<sup>®</sup> (BOELAERT *et al.*, 1993) e terapias imunossupressoras com destaque para o uso da predsona (ZABEL, 1997).

Fungos pertencentes à classe Zygomycetes, ordem Mucorales causam um grupo distinto de infecções designadas Mucormicose, a quarta causa mais comum de infecção fúngica em pacientes imunocomprometidos (PANDIT & RAHEEMA, 2003). Muitos autores, arbitrariamente, atribuem ao gênero *Mucor* a etiologia das mucormicoses em geral, baseando-se apenas no diagnóstico das formas parasíticas nos cortes histológicos, em detrimento da confirmação em cultura (RIBES, VANOVER-SAMS, & BAKER, 2000). Porém, vale destacar que *Mucor* sp é apontado como o terceiro gênero implicado nesta patologia (CHAYAKULKEEREE, GHANNOUN & PERFECT, 2006). As manifestações clínicas são, basicamente, divididas de acordo com o estado imunológico do paciente. Os pacientes imunocomprometidos tendem a apresentar doença invasiva de órgãos sólidos, enquanto hospedeiros imunocompetentes demonstram predominantemente infecções cutâneas ou de unhas. Casos pulmonares (DAVIES, 1972), rino-cerebrais (HENDRICKSON, OLSHAKER & DUCKETT, 1999), rino-orbitais (GÖKÇİL *et al.*, 1998) e gastrointestinais (MARAVÍ-POMA *et al.*, 2004) são os de maior incidência.

---

Inúmeras formas de transmissão vêm sendo descritas para estas espécies. De forma semelhante a outros Mucorales, casos rino-cerebrais e pulmonares têm sido atribuídos à inalação dos conídios. As infecções do trato digestivo são provavelmente adquiridas através da ingestão de conídios contidos nos alimentos ou através de manipulação de ervas (OLIVER *et al.*, 1996). A forma cutânea é resultante de uma exposição dos tecidos subjacentes à pele por injeções (DRESCHLER, 1960), picadas de insetos (PREVOO, STARINK & HAAN, 1991), e outras formas de implantação traumática dos esporos (COSTA *et al*

## **1.2 - TRATAMENTO DAS ZIGOMICOSSES**

No que diz respeito ao tratamento destas infecções, o antifúngico utilizado é a anfotericina B<sup>®</sup>. Contudo, a abordagem terapêutica mais eficaz lança mão de uma combinação de altas doses deste medicamento (HERBRECHT *et al.*, 2001), remoção cirúrgica e, ainda, o controle das condições predisponentes dentre as principais, neutropenia e diabetes mellitus (GONZALEZ, RINALDI & SUGAR, 2002). Faz-se necessário ressaltar a nefrotoxicidade desse fármaco, limitando seu uso em pacientes com doenças renais (HARBARTH *et al.*, 2002). Algumas drogas têm sido utilizadas com relativo sucesso, com destaque para o Posaconazol<sup>®</sup>, utilizado no tratamento de um paciente recém-transplantado de coração e rim (TOBÓN *et al.*, 2003), porém a maioria dos azóis não apresenta bons resultados para o tratamento da zigomicose ocasionada por *Mucor* (VAN CUTSEM *et al.*, 1989; DANNAOUI *et al.* 2003).

Muitas medidas adjuntivas têm sido propostas para combater a zigomicose, dentre elas a utilização do fator estimulante de granulócitos-macrófagos (GMSF), transfusão de leucócitos, uso de interferon gamma (IFN-  $\gamma$ ) e oxigenoterapia hiperbárica. No entanto, ainda não existem estudos suficientes no sentido de assegurar a eficácia dessas medidas no tratamento de rotina (CHAYAKULKEEREE, GHANNOUN & PERFECT, 2006).

## **1.3 - PAREDE CELULAR FÚNGICA**

A parede celular dos fungos apresenta diferentes constituintes químicos, dentre eles: polissacarídeos, proteínas e lipídeos. Os principais componentes da parede celular são os carboidratos do tipo hexoses e hexosaminas, as quais formam as mananas, glucanas, galactanas e heteropolissacarídeos (Bartnicki-Garcia, 1968;

---

Bowman & Free, 2006). A determinação da rigidez da parede e manutenção da morfologia celular dos fungos tem sido atribuída à presença dos polissacarídeos de superfície e de seus complexos protéicos (ANGLUSTER & TRAVASSOS, 1972). A constituição desta estrutura pode variar entre as diferentes espécies e conforme o tempo de cultivo, uma vez que muitas substâncias presentes em hifas jovens, “desaparecem” nas mais antigas dando lugar a depósitos de outros materiais que podem mascarar os constituintes iniciais. Outros fatores que podem afetar esta composição são as diferentes condições de cultivo, nas quais são alterados fatores como: nutrientes (fontes de carbono e nitrogênio), temperatura e pH (FIRON, LESAGE & BUSSEY, 2004).

Inicialmente, era atribuído à parede celular apenas o papel estrutural, conferindo rigidez e proteção ao protoplasto, na manutenção da morfologia característica dos fungos. Hoje, com um melhor esclarecimento a respeito da funcionalidade desta estrutura, tornou-se evidente a sua essencial participação em quase todos os aspectos da biologia e da patogenicidade dos fungos (CHAFFIN *et al.*, 1998; FIRON, LESAGE & BUSSEY, 2004; NIMRICHTER *et al.*, 2005; BOWMAN & FREE, 2006).

O fato da parede celular ser vital para os fungos e de não estar presente nas células hospedeiras dos mamíferos, faz dela um alvo bastante interessante para pesquisa de seus componentes, visando o desenvolvimento de novos antifúngicos. Alguns carboidratos presentes na parede celular, por serem únicos e essenciais para o fungo, tornam-se bons alvos para ação de fármacos (GEORGOPAPADAKOU & TKACZ, 1995). Atualmente, existem dois grupos de antifúngicos que apresentam como alvo a síntese de componentes polissacarídicos da parede celular, as equinocandinas (responsável pela inibição da síntese de  $\beta$ -1,3 glucana) e as nikkomicinas (responsável

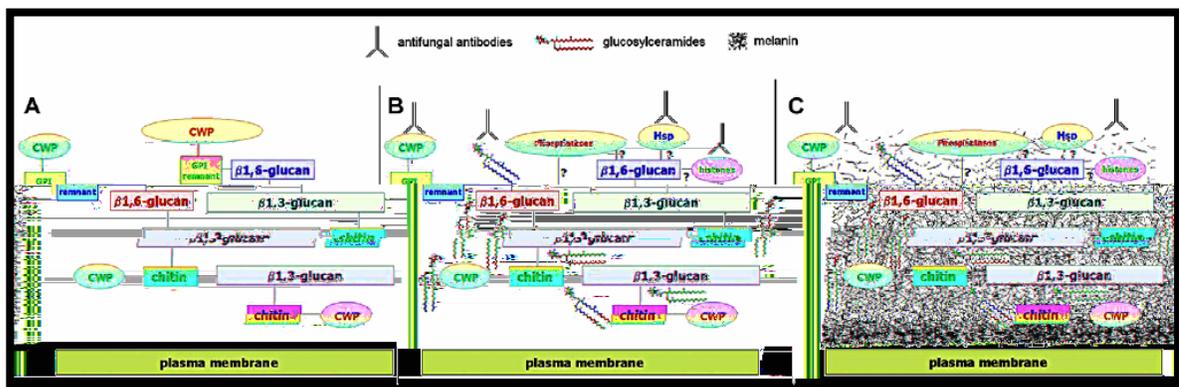
---

pela inibição da síntese de quitina) (ODDS, BROWN, & GOW, 2003). Entretanto, muitos destes antifúngicos apresentam um espectro de ação limitado e dificuldades na reprodutibilidade da eficácia *in vivo*. O conhecimento da estrutura e biossíntese da parede celular fúngica é de extrema importância para a busca de novos agentes quimioterápicos (GOZALBO *et al*, 1993; BOWMAN & FREE, 2006).

Na etapa inicial do reconhecimento celular, a constituição química da parede dos fungos desempenha um papel fundamental, uma vez que esta é uma das estruturas mais externas dos fungos, podendo assim entrar em contato com a célula hospedeira e, mediante a exposição dos seus determinantes antigênicos, são estabelecidas interações entre o patógeno e a célula hospedeira. Dessa forma, pode-se dizer que cada parede celular possui um verdadeiro “código de glicanas” responsável pelas interações estabelecidas entre ambos (SAN-BLAS, 1982; NIMRICHTER *et al*, 2005; RUIZ-HERRERA *et al.*, 2006).

Como dito anteriormente, a parede celular pode variar na composição química e seus componentes podem desempenhar várias funções ao longo do ciclo de vida destes microrganismos, inclusive nos fungos patogênicos. Nesse sentido, vários componentes da superfície celular têm sido intensamente caracterizados, destacando-se: polissacarídeos (SOARES *et al.*, 1995, PINTO *et al.*, 2004), enzimas hidrolíticas (KNEIPP *et al.*, 2004; GOEL *et al.*, 2006; EL-TARABILY *et al.*, 2000), proteínas de choque térmico (MATTHEWS & BURNIE, 2004), glicosilesfingolípídios (RODRIGUES *et al.*, 2000; PINTO, *et al.*, 2002; BARRETO-BERGTER, PINTO & RODRIGUES, 2004), melanina (NOSANCHUK & CASADEVALL, 2003; ALVIANO *et al.*, 2004a) e histonas (NOSANCHUK *et al.*, 2003). Estes componentes podem ser alvos para anticorpos ou drogas, que controlem o crescimento de patógenos fúngicos tanto *in vitro* quanto *in vivo*

(NIMRICHTER *et al.*, 2005). Desta forma, a identificação e caracterização dos componentes de superfície, bem como suas possíveis funções pode auxiliar o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas (Figura 2) (VAN BURIK & MAGEE, 2001).



**Figura 2:** Desenho esquemático dos componentes básicos de parede celular (A) e a proposta atual de distribuição dos demais componentes da parede celular fúngica (B e C). Com destaque na figura C, a presença da melanina em várias espécies fúngicas. Fonte: Nimrichter *et al.*, 2005.

#### 1.4 - PAREDE CELULAR DOS ZIGOMICETOS

Os zigomicetos apresentam a quitina (quitosana) como principal componente estrutural de parede celular. Em *Mucor*, além da quitina, observam-se mananas, ácidos urônicos, proteínas e polifosfatos. As fibrilas de quitina encontram-se embebidas em uma matriz de poliuronídeos (mucoran e ácido mucórico), glicoproteínas e glicopeptídeos (DOW & RUBERY, 1977; DOW, DARNALL & VILLA., 1983; ORLOWSKI, 1991). A contribuição dos componentes fibrilares para a massa total da parede celular não é muito diferente entre leveduras e hifas, fato que também é observado no conteúdo de ácido glucurônico. Contudo, em contraste com outros fungos, a parede possui pouca quantidade de glucanas, embora a parede dos esporos apresente mais

---

de 40% de carboidratos em sua composição. A diferença mais expressiva entre as paredes de leveduras e hifas é a quantidade de manose, que pode ser até oito vezes maior em leveduras (BARTNICKI-GARCIA, 1968). Em 1977, Dow & Rubery demonstraram que a parede celular das formas de levedura e micélio de *M. rouxii* apresentava polissacarídeos ácidos de alta massa molecular. Estes polissacarídeos continham alta quantidade de ácido glucurônico. Contudo, havia algumas diferenças entre as duas formas: na forma micelial o polissacarídeo era mais ácido que na levedura e o micélio apresentava maior quantidade de fucose e galactose. Neste mesmo ano, Datema, Van de Ende & Wessels, descreveram a presença de polímeros polianiônicos em *Mucor mucedo*. Eles eram constituídos majoritariamente de ácido glucurônico, mas também continham grandes quantidades de fucose, manose e galactose. Acredita-se que a grande quantidade de polifosfatos presentes em semelhantes quantidades nas paredes das formas vegetativas, implique na neutralização dos polímeros policatiônicos de quitina-quitosan (BARTINICKI-GARCIA, 1968; ORLOWSKI, 1991).

Observações microscópicas de *Mucor* spp. revelaram que a parede da hifa é relativamente fina, eletrônica-densa, não-fibrosa e indiferenciada, apesar da parede da levedura ser relativamente grossa, difusa, e fibrosa e visivelmente diferenciada em duas camadas distintas (BARTINICK-GARCIA & LIPPMAN., 1969).

A camada externa da parede celular dos esporos é completamente diferente da porção vegetativa da mesma, tanto no aspecto morfológico quanto químico. Ela é relativamente enriquecida em proteínas e lipídeos, além de conter grandes quantidades de glucanas e melanina, que se encontram completamente ausentes nas formas de levedura e de hifa de *Mucor* spp. Em contraste, os níveis de quitina-quitosana, ácido glucurônico e fosfatos encontram-se em menor teor comparado às células vegetativas.

---

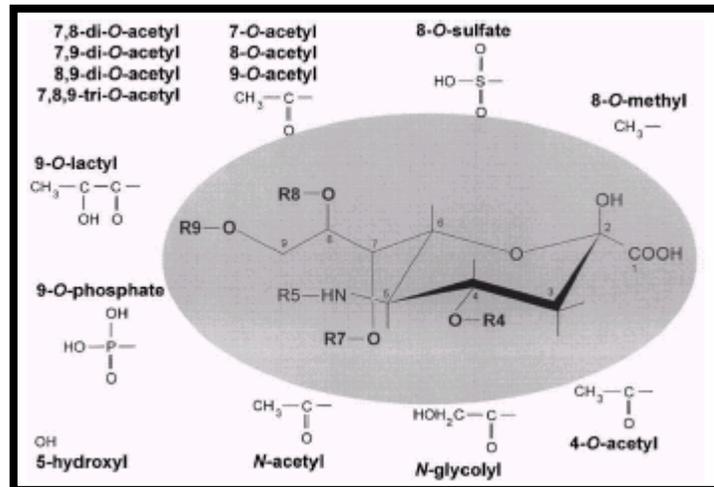
Outros componentes, tais como galactose e fucose estão ausentes nas paredes dos esporos (BARTNICKI-GARCIA, 1968a; ORLOWSKI, 1991).

Apesar dos estudos abordando os componentes básicos de parede celular de *Mucor* sp serem inegavelmente consagrados, faltam estudos mais atuais que busquem estruturas de superfície possivelmente relacionadas com a patogenicidade.

### 1.5 - ÁCIDOS SIÁLICOS

Os açúcares além de serem importantes componentes da superfície celular, estão implicados em fenômenos como antigenicidade, sítios de ligação hormonal, fagocitose, pinocitose e no reconhecimento patógeno-hospedeiro (SHARON & LIS, 1993; LEHMANN, TIRALONGO & TIRALONGO, 2006).

Os ácidos siálicos constituem uma família de monossacarídeos ácidos de 9 átomos de carbono derivados do ácido neuramínico, os quais apresentam como moléculas fundamentais as formas *N*-aciladas, ácidos *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) e *N*-glicolilneuramínico (Neu5Gc). A maior parte das demais modificações, resultam de *O*-acetilação em um dos muitos grupamentos hidroxila, em C-4, -7, -8 ou -9, bem como a introdução de uma dupla ligação entre C-2 e C-3 (SCHAUER *et al.*, 1995), como demonstrado na figura 3. São ácidos relativamente fortes (ácidos siálicos livres, pKa= 2,6), isto permite que se apresentem completamente desprotonados em pH fisiológico, contribuindo dessa forma com carga negativa às células que os possuem (SCHAUER *et al.*, 1995; KELM & SCHAUER, 1997; SCHAUER, 2004).



**Figura 3:** Estrutura dos ácidos siálicos (Schauer, 2004). Demonstração da estrutura química do ácido neuramínico na área cinza e as possíveis regiões de substituição (R). Na parte externa, encontram-se representadas as mais freqüentes substituições com suas respectivas posições.

Estes açúcares ocorrem principalmente como componentes terminais de glicoproteínas e glicolípideos de superfície celular, formando os sialoglicoconjugados. Nestes, os ácidos siálicos apresentam-se ligados a resíduos de galactose terminal (SCHAUER *et al.*, 1995; KELM & SCHAUER, 1997; SCHAUER, 2004). Tais estruturas podem ser detectadas através da utilização de lectinas específicas como *Maackia amurensis* (MAA) e *Sambucus nigra* (SNA) que reconhecem ligações do tipo  $\alpha$ 2,3 e  $\alpha$ 2,6, respectivamente entre esses açúcares. São os únicos representantes de 9 carbonos encontrados em procaríotos e, nos eucariotos, estão envolvidos em inúmeras interações célula-célula e célula-molécula como, por exemplo, agentes de estabilização de glicoconjugados e membranas celulares; mediadores da regulação entre as células e agindo como mensageiros químicos; reguladores da função de receptor transmembrana; afetando o transporte de membrana; controlando a meia-vida de glicoproteínas e células circulantes, além de contribuírem para a permeabilidade seletiva de estruturas como o endotélio glomerular (VIMR *et al.*, 2004).

## **1.6 - DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS SIÁLICOS**

Diversas metodologias têm sido utilizadas na determinação dos ácidos siálicos. Estas moléculas podem ser detectadas quimicamente por cromatografia em camada fina de alta resolução (HPTLC), pela cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), por dosagem colorimétrica, dentre vários outros métodos (REUTER & SCHAUER, 1994; ZANETTA *et al.*, 2001).

As lectinas (moléculas de natureza protéica ou glicoproteica que se ligam a sítios contendo carboidratos específicos) podem atuar no reconhecimento de moléculas bem como mediar a atividade biológica dos carboidratos de superfície celular (WEIS *et al.*, 1992). A interação com lectinas tem sido amplamente utilizada no mapeamento de açúcares ou glicoconjugados na superfície de microrganismos (SOUZA *et al.*, 1986; SOARES *et al.*, 1993; RODRIGUES *et al.*, 1997, 2003a; SOARES *et al.*, 2000; WASYLKA, SIMMER & MOORE, 2001; ALVIANO *et al.*, 2004b). A existência de lectinas específicas para diversos açúcares faz delas ferramentas muito importantes na análise dos diferentes carboidratos de superfície, pois estas se combinam forte e reversivelmente e podem ser removidas completamente por açúcares de pequena massa molecular para os quais são específicas (SLIFKIN & DOYLE, 1990).

## **1.7 - ÁCIDOS SIÁLICOS EM FUNGOS**

Os ácidos siálicos vêm sendo caracterizados principalmente em células animais e algumas espécies de vírus, bactérias e protozoários, bem como em fungos. Em diversas espécies microbianas, acredita-se que atue como molécula de anti-reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro humano, sendo assim um componente anti-fagocítico nas espécies que os expõem (SCHAUER *et al.*, 1995;

---

ALVIANO *et al.* 1999; ANGNATA & VARKI, 2002). Em fungos patogênicos, uma crescente lista de relatos comprova a ocorrência de ácidos siálicos em *Cryptococcus neoformans* (RODRIGUES *et al.* 1997, 2003a), *Sporothrix schenckii* (ALVIANO *et al.* 1982; ODA *et al.* 1983), *Fonsecaea pedrosoi* (SOUZA *et al.*, 1986; ALVIANO *et al.*, 2004b), *Paracoccidioides brasiliensis* (SOARES *et al.*, 1993), *Candida albicans* (SOARES *et al.*, 2000) e *Aspergillus fumigatus* (WASYLNKA, SIMMER, & MOORE, 2001).

O primeiro fungo relatado em possuir ácidos siálicos foi *S. schenckii*, apresentando os derivados ácido *N*-glicolilneuramínico e *N*-acetilneuramínico compondo glicolípídeos de superfície em leveduras (ALVIANO *et al.*, 1982). Em seguida, o mesmo grupo avaliou a influência destes açúcares em experimentos para determinar o índice de fagocitose, e foi observado um claro aumento deste após a remoção enzimática dos resíduos de ácido siálico, comprovando dessa forma que estes açúcares aumentariam as chances de sobrevivência do fungo na ausência de uma resposta imune eficaz por parte do hospedeiro (ODA *et al.*, 1983).

Os mesmos derivados descritos em *S. schenckii* foram detectados em conídios do principal agente etiológico da cromoblastomicose, *F. pedrosoi*, porém apenas Neu5Ac foi detectado nas formas de micélio. Este fato sugere a relação entre a expressão dos diferentes tipos de siálico e a morfogênese (SOUZA *et al.*, 1986). Dados recentes (ALVIANO *et al.*, 2004b) confirmaram estes achados e avaliaram concomitantemente a presença de sialidases. As células escleróticas, de grande importância por serem as formas encontradas em exames histopatológicos também foram submetidas aos mesmos ensaios realizados para conídios e micélio, porém não

---

houve detecção de ácido siálicos e tampouco detecção de atividade sialidásica para esta forma fúngica.

*P. brasiliensis* foi o primeiro fungo causador de micose sistêmica relatado em apresentar siálico em sua superfície e, ao adicionar outras metodologias químicas, tais como a cromatografia líquido-gasosa aliada à espectrometria de massa (GC-MS), foi possível a caracterização do Neu5Ac, tanto em micélio quanto em levedura (SOARES *et al.*, 1993). Estas mesmas técnicas foram usadas para caracterizar Neu5Ac em duas cepas de *C. albicans*, com a adição de experimentos para interação a um substrato catiônico, a poli-L-lisina, sugerindo através desta metodologia a contribuição para a carga negativa à superfície fúngica (SOARES *et al.*, 2000). Contudo, especialmente no caso de *C. albicans*, onde um dos principais sítios de interação é a mucosa bucal, uma região repleta de mucina salivar (fluido rico em ácido siálico), a presença de grande concentração de tais moléculas aniônicas na superfície do fungo impõe dificuldade à adesão, sendo a expressão de siálico neste caso prejudicial à colonização do fungo (SWEET *et al.*, 1995).

Rodrigues e colaboradores (1997) fizeram um relevante estudo de identificação de ácidos siálicos em *C. neoformans*, agente etiológico da criptococose. Neste trabalho, foram exploradas diversas metodologias, tanto químicas quanto biológicas e, através da interação com a amostra padrão de vírus Influenza C foi possível detectar ácidos siálicos 9-O-acetilados (Neu5,9Ac<sub>2</sub>), descrito pela primeira vez em fungos. Estudos aplicados também foram efetuados, submetendo o fungo à adesão em poli-L-lisina e à interação com macrófagos e constatou-se que estas moléculas estariam relacionadas com adesão às células do hospedeiro.

---

Outros fungos que atingem via respiratória também foram avaliados quanto à possível influência do ácido siálico na patogenicidade, e foi comprovado que conídios de *Aspergillus fumigatus* (BOUCHARA *et al.*, 1997) e de *Penicillium marneffeii* (HAMILTON *et al.*, 1998) reconhecem laminina por um mecanismo dependente de ácido siálico, sendo que em *A. fumigatus* os experimentos sugeriam a existência de uma lectina que mediaría esta adesão (BOUCHARA *et al.*, 1997). Em 2002, Tronchin e colaboradores comprovaram esta hipótese através da purificação e caracterização de uma polipeptídeo de 32 kDa, com reconhecimento específico para ácido siálico. Dessa forma, foi sugerido que em um epitélio pulmonar lesionado por bactérias ou mesmo fármacos, muito comum em pacientes imunocomprometidos, a exposição dessa glicoproteína permitiria a adesão desses patógenos (HAMILTON *et al.*, 1998). Adicionalmente, foi encontrada uma densidade 3 a 20 vezes maior de ácido siálico nesta espécie patogênica do que nas espécies não-patogênica *A. auricomus*, *A. wentii* e *A. ornatius* (WASYLNKA, SIMMER, & MOORE, 2001).

### **1.8 - ENZIMAS PROTEOLÍTICAS**

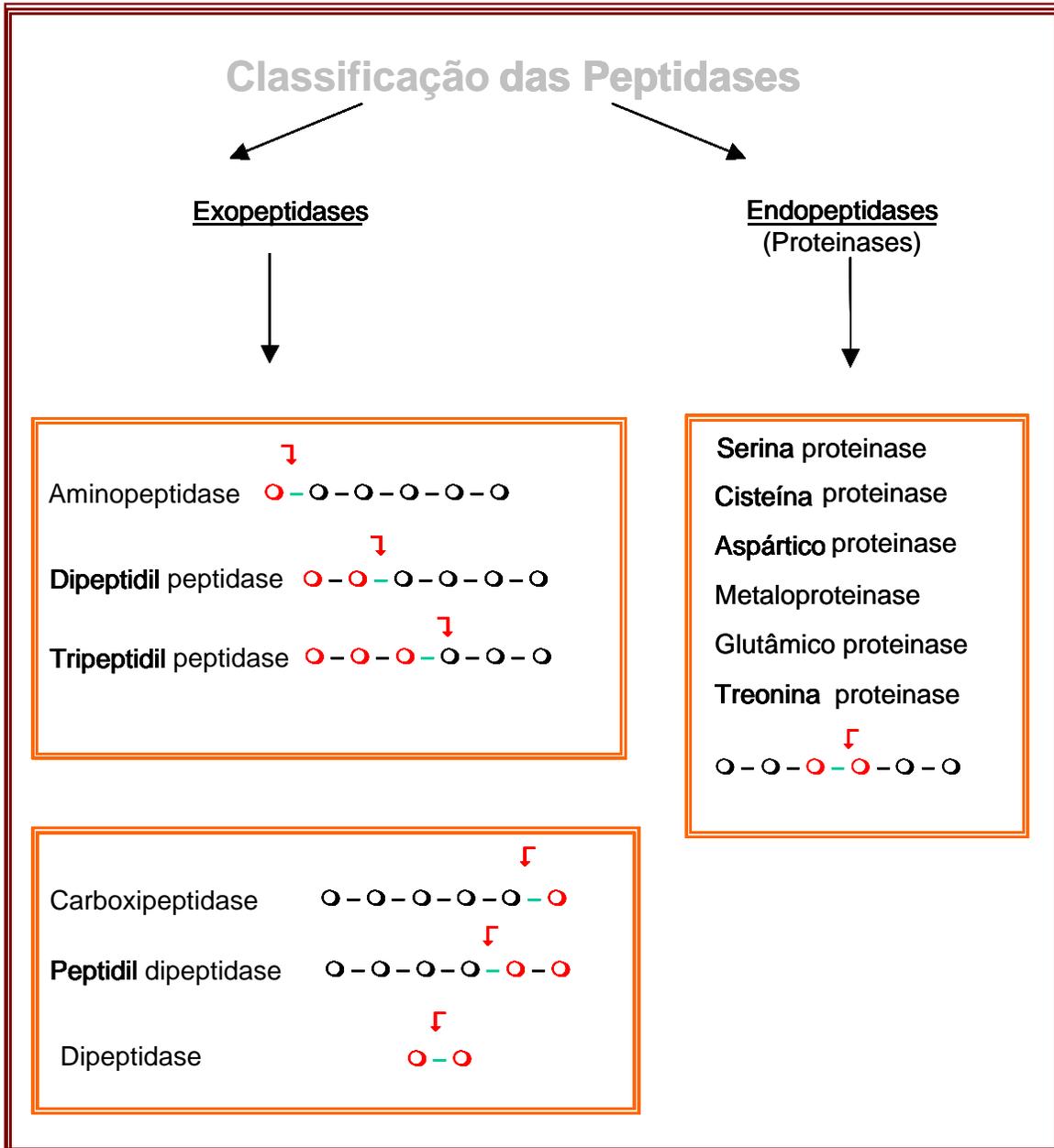
Proteases, peptidases ou peptídeo hidrolases são enzimas encontradas em vários organismos, desde vírus até humanos. Estas são enzimas primordiais, uma vez que são responsáveis pela catálise de várias reações biológicas essenciais, como remodelação tecidual, coagulação sangüínea, reações imunes, metabolismo protéico, regulação do ciclo celular, crescimento e diferenciação celular, processamento de antígeno, angiogênese, morte celular programada, dentre outras funções (BEYNOM & BOND, 1989; RAO *et al.*, 1998; HOOPER, 2002). O crescente relato de doenças como a Síndrome de Alzheimer, metástase em câncer e desordens inflamatórias relacionadas

---

ao desequilíbrio na função das peptidases, só reforçam a importância que estas apresentam no equilíbrio homeostático (BARRET, RAWLINGS & O'BRIEN, 2001; HOOPER, 2002; REED & KITA, 2004).

As peptidases são classificadas de acordo com o ponto de clivagem proteolítica. Quando degradam os terminais de uma cadeia polipeptídica são denominadas exopeptidases, e endopeptidases ou proteinases, quando catalisam a clivagem de ligações peptídicas internas. As exopeptidases podem ainda ser subdivididas em carboxi ou aminopeptidases, quando hidrolisam ligações peptídicas no terminal carboxi ou amino da cadeia de aminoácidos do substrato, respectivamente (MaCDONALD, 1985; BARRET, 1986; ROOSE & VAN NOORDEN, 1995). As peptidases podem ser ainda relacionadas com base em suas propriedades físico-químicas, quanto ao pH ótimo de atividade (peptidases ácidas, neutras ou alcalinas), sensibilidade a inibidores proteolíticos, modulação por metal, capacidade de degradar proteínas específicas (ex: elastase, collagenase) e, ainda quanto a sua relação evolutiva, isto é, a similaridade estrutural e funcional que uma peptidase apresente com outras enzimas já bem caracterizadas, valendo neste ponto destacar a importância da base internacional de dados MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>), responsável pela reunião das peptidases em famílias (assemelham-se na seqüência de aminoácidos do centro ativo) e clans (assemelham-se na estrutura terciária). Porém, a classificação que tem por base os importantes grupos químicos presentes em seu sítio ativo é ainda a mais aceita e a partir deste critério, as endopeptidases e as carboxipeptidases foram agrupadas, em seis e três classes principais, respectivamente. Nesta classificação, as endopeptidases foram subdivididas em: serina, cisteína, aspártico, metalo, treonina e glutâmico-endopeptidases, ao passo que as carboxipeptidases foram subdivididas em serina,

metalo e cisteína-carboxipeptidases (Figura 4) (ROOSE & VAN NOORDEN, 1995; BARRET, RAWLINGS & O'BRIEN, 2001).



**Figura 4:** Esquema de classificação das peptidases. Fonte: ROOSE & VAN NOORDEN, 1995).

---

Algumas peptidases celulares degradam exclusivamente proteínas e peptídeos residentes no interior da célula, incluindo peptidases citosólicas e mitocondriais. Outras são sintetizadas para o espaço extracelular (peptidases secretadas e/ou excretadas) como, por exemplo, peptidases lisossomais e de membrana plasmática (WOLF, 1992). A atividade proteolítica nas células deve ser altamente regulada para prevenir a degradação inapropriada e descontrolada de proteínas. Portanto, a ação de uma peptidase deve ser limitada por sua localização subcelular e regulada em inúmeras etapas (RAWLINGS, TOLLE & BARRET, 2004). As peptidases secretadas para o meio extracelular podem funcionar como um mecanismo adaptativo importante durante o ciclo de vida de diferentes microrganismos (SANTOS *et al.*, 1999; HUBE, 2000; MONOD *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2005).

Muitos inibidores de peptidases naturais e sintéticos vêm sendo identificados. Os inibidores naturais desenvolvem funções importantes na regulação pós-traducional da atividade proteolítica em microrganismos e em seus hospedeiros, ao passo que os inibidores sintéticos são muito usados como medicamentos, e com grande validade na pesquisa básica como ferramentas de subclassificação das peptidases em seus grupos principais (RAWLINGS, TOLLE & BARRET, 2004). A inibição de peptidases *in vitro* é o primeiro passo para as pesquisas subseqüentes, que visam entender como estas enzimas podem ser reguladas *in vivo* (HOOPER, 2002).

Cada grupo de peptidase possui um mecanismo proteolítico distinto e por isso diferentes características enzimáticas e sensibilidade frente a inibidores proteolíticos. As quatro principais classes (serina, metalo, cisteína e aspártico peptidase) podem ser diferenciadas experimentalmente usando inibidores proteolíticos clássicos (HOOPER, 2002). As serinas peptidases possuem uma tríade catalítica formada por uma serina,

---

uma histidina e um resíduo de aspártico. O fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) é considerado como um inibidor de serina peptidases, embora possa inibir algumas cisteína peptidases. As famílias das serina peptidases são agrupadas em duas superfamílias, as das Tripsinas (tri e quimiotripsina) e das Subtilisinas (HU & LEGER, 2004). As metalopeptidases precisam de um íon metal no sítio catalítico para exercer sua função. Agentes quelantes como, EDTA, EGTA e 1,10-fenantrolina removem íons metais do sítio catalítico dessas enzimas, inibindo sua atividade catalítica. A principal superfamília de metalopeptidase é a família das peptidases zincinas, que possuem zinco ligado a duas histidinas e um glutâmico presente no centro ativo (MYOSHI & SHINODA, 2000). As cisteína peptidases possuem como inibidor clássico o (L-*trans*-epoxisuccinil leucilamido-(4-guanidino) butano) (E-64) e requerem para sua atividade catalítica a existência da díade cisteína-histidina, além de um agente redutor no meio de reação (RAO *et al.*, 1998). As duas maiores superfamílias dessa classe são a família da papaína e da caspase (BARRET, RAWLINGS & O'BRIEN, 2001). As aspártico peptidases possuem seu sítio catalítico formado por dois resíduos conservados de ácido aspártico. O mecanismo de ação dessas enzimas é ainda desconhecido. As aspártico peptidases são divididas em duas grandes famílias, pepsina-“like” e não-pepsina-“like” aspártico peptidase, sendo a grande maioria inibida por pepstatina A (NORTHROP, 2001).

A diversidade das peptidases, assim como a sua larga distribuição em diferentes organismos, constituindo regiões como organelas e tecidos, demonstra como as peptidases são fatores essenciais para a manutenção da homeostase em organismos procariotos e eucariotos. As peptidases microbianas também apresentam contribuição essencial para o ciclo de vida dos mesmos, porém nos microrganismos patogênicos,

---

elas ainda podem desempenhar funções como as de toxinas, bem como atuar de forma indireta na patogenicidade. É sabido que para a invasão de tecidos hospedeiros, os microrganismos, incluindo fungos, produzem enzimas hidrolíticas que destroem ou causam danos na membrana celular de células hospedeiras, levando à transposição da membrana basal e conseqüente disseminação do microrganismo (MIYOSHI & SHINODA, 2000).

As peptidases secretadas para o meio extracelular podem funcionar como um mecanismo adaptativo importante durante o ciclo de vida de diferentes microrganismos (SANTOS *et al.*, 1999; HUBE, 2000; SANTOS *et al.*, 2002; MONOD *et al.*, 2002; NAGLIK *et al.*, 2003). O estudo das peptidases constitui um alvo importante para uma melhor compreensão dos fatores de virulência de um grande número de microrganismos. Dessa forma, as enzimas proteolíticas podem ser úteis no controle e prevenção de infecções.

### **1.8.1 - PEPTIDASES EM FUNGOS**

As peptidases são encontradas em vários microrganismos, com a função sobretudo de prover nutrientes para o metabolismo dos mesmos. Peptidases produzidas por fungos patogênicos têm sido alvos de vários estudos nos últimos anos (HUBE, 2000; MIYOSHI & SHINODA, 2000; VAN BURIK & MAGEE, 2001; MONOD *et al.*, 2002; HU & LEGER, 2004; SCHALLER *et al.*, 2005). Neste grupo, as peptidases podem desempenhar papéis adicionais durante a infecção fúngica, participando ativamente na adesão, penetração, evasão do sistema imune, proliferação e

---

diferenciação celular (HUBE, 2000; VAN BURIK & MAGEE, 2001; SCHALLER *et al.*, 2005).

Em *Aspergillus fumigatus* foi descrito que peptidases secretadas são capazes de degradar proteínas fibrilares, tais como elastina e colágeno, que podem auxiliar na disseminação de *A. fumigatus*, favorecendo a penetração desse fungo em diferentes tecidos do hospedeiro ocasionando aspergilose invasiva (REICHARD, 1998). Também em *A. fumigatus* foi encontrada uma serina peptidase (Alp2) ligada à parede celular, com atividade em uma faixa ampla de pH (4,5-11,0) e com similaridade à serina peptidase de *Saccharomyces cerevisiae* e *A. niger*. Essa peptidase se mostrou necessária para a esporulação desse fungo, além de atuar como alérgeno em pacientes que manifestam a aspergilose broncopulmonar alérgica (REICHARD *et al.*, 2000; REED & HIROHITO, 2004). KOGAN e colaboradores (2004) mostraram a participação de serina e cisteína peptidases secretadas por *A. fumigatus* na interação com células alveolares (A549), ocasionando desorganização do citoesqueleto de actina e adesão focal, processos que participam respectivamente da internalização de conídios e formação de hifa, com subsequente invasão tecidual.

*Candida albicans* é o fungo oportunista mais bem conhecido quanto ao estudo de enzimas hidrolíticas, dentre as quais as aspártico peptidases secretadas (SAPs) vêm sendo extensivamente caracterizadas (HUBE, 2000; SCHALLER *et al.*, 2005). A atividade proteolítica das SAPs, uma família composta de 10 genes diferentes os quais codificam para 10 distintas SAPs. Oito de seus membros, SAPs 1-8, são secretadas e as SAP 9-10 estão ancoradas a membrana via âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). A patogenicidade de *C. albicans* é regulada por um grupo de fatores de virulência, que

---

inclui os genes que codificam para as Saps (SCHALLER *et al.*, 2005). Até 2002, essas aspártico peptidases secretadas eram descritas como as únicas atividades peptidásicas secretadas por *C. albicans*. COSTA e colaboradores (2003) descreveram pela primeira vez a secreção de duas novas atividades peptidásicas diferentes em *C. albicans*, pertencentes às classes de metalo e serina peptidases. Neste estudo, os autores analisaram 44 cepas de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças HIV-positivas e crianças saudáveis, que apresentaram um padrão diferente de peptidases secretadas para o meio extracelular entre os dois grupos estudados. Em *C. guilliermondii* isolada de paciente HIV-positivo, também foi testada a secreção de peptidases. Esta cepa foi capaz de secretar uma serina peptidase de 50 kDa com atividade proteolítica em pH fisiológico, capaz de clivar um amplo espectro de substratos protéicos como laminina, fibronectina, soro albumina humana e imunoglobulina G (SANTOS & SOARES, 2005). Os autores sugerem que essas atividades podem contribuir para a disseminação das leveduras para órgãos mais profundos a partir das lesões, bem como protegê-las contra resposta imune do

-6( de )TJ/TT2 1 Tf-0.0004 Tc 0.285.05 Tc 12 Oryptococcude eoform albicans

---

do patógeno, bem como na evasão do sistema imune pela clivagem de SOWgp, um antígeno imunodominante (HOGAN, KLEIN & LEVITZ, 1996; HUNG *et al.*, 2005).

Recentemente, Silva e colaboradores (2006) descreveram a secreção de metalopeptidases acídicas no fungo oportunista *Pseudallescheria boydii*. Foi sugerido que estas enzimas podem estar contribuindo para a patogenicidade por este fungo, uma vez que foi demonstrado a degradação de uma série de substratos das barreiras físicas e imunes do hospedeiro, incluindo a degradação de compostos sialilados. O mesmo grupo, através de estudos de Palmeira e colaboradores (2006a), relatou a presença de metalo e aspártico-peptidases, dependendo do meio no qual foi cultivado a forma de conídio de *Fonsecaea pedrosoi*, demonstrando que estas enzimas têm suas expressões moduladas de acordo com o meio de cultivo. Na forma de micélio foi sugerido o efeito positivo da utilização de inibidores de peptidases de HIV na inibição do crescimento do *F. pedrosoi* (PALMEIRA *et al.*, 2006b).

### **1.8.2 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS NO GÊNERO MUCOR**

O gênero *Mucor* apresenta grande destaque na biotecnologia sendo responsável pela produção de várias enzimas como: amilase, lipase, pectinase e peptidase (ALVES *et al.*, 2002). *M. hiemalis* apresenta peptidases ácidas associadas à superfície do micélio (WANG, 1967). Contudo, *M. bacilliformis* foi relatado em secretar estas peptidases para o meio de cultivo (BOTTARO CASTILLA *et al.*, 1982), tendo sido publicado recentemente por Machalinski e colaboradores (2006) os aspectos estruturais desta aspártico-peptidase. *Rhizomucor pusillus* e *M. miehei*, duas espécies estreitamente relacionadas, são capazes de secretar aspártico-peptidases, também

---

conhecidas como mucor-renina, para o meio de cultivo. Estas enzimas possuem alta atividade de coagulação do leite (clivagem seletiva da  $\kappa$ -caseína) e baixa atividade proteolítica, possibilitando então seu uso como substituta da quimosina bovina na indústria de laticínios (RAO *et al.*, 1998; Andrade *et al.*, 2002). Em 1991, Kamada e colaboradores descreveram a presença de uma peptidase na fração de quitossomos purificados. Esta enzima foi relatada em degradar a quitina-sintetase das preparações de levedura de *M. rouxii*. Muitas aminopeptidases e carboxipeptidases têm sido caracterizadas em *M. racemosus* e estes estudos verificaram que algumas destas carboxipeptidases mostraram-se específicas conforme a morfologia do fungo, sendo observado ainda que a atividade peptidásica é maior durante as fases de transição de levedura para hifa e na germinação dos esporos (DiSANTO & LOGAN, 1989; Di SANTO, LI & LOGAN, 1992). Recentemente, Alves e colaboradores (2005) avaliaram a capacidade de produção de proteases extracelulares em 13 espécies de *Mucor* e todas apresentaram atividade peptidásica numa faixa de pH que variou de 3.8 a 7.8, sendo *M. racemosus* f. *chibinensis* a espécie que demonstrou melhor resposta. É interessante notar que este estudo apresentou várias espécies iguais que possuem algumas variedades como: *M. circinelloides*, *M. hiemalis* e *M. piriformis* que apresentaram diferentes padrões da atividade proteolítica, confirmando-se então que eram variações destas espécies. Os diferentes estudos citados demonstram como são complexos os mecanismos envolvidos na patogenicidade dos fungos, e que não existe um único fator que possa ser responsável pela virulência de um determinado microrganismo (VAN-BURIKI & MAGEE, 2001). Por isso, estudos visando esclarecer as diferentes estruturas fúngicas, sobretudo daqueles cada vez mais implicados em patologias, como é o caso

das espécies do gênero *Mucor* se tornam extremamente necessários para tentar esclarecer a patogênese da Zigomicose.

## **OBJETIVOS**

## 2 – **OBJETIVOS**

### 2.1. **Objetivo Geral**

Isolar e identificar ácidos siálicos em diferentes espécies do gênero *Mucor* e avaliar o envolvimento dos ácidos siálicos na interação entre *Mucor polymorphosporus* e as células do hospedeiro, bem como caracterizar parcialmente peptidases secretadas por esta espécie.

### 2.2. **Objetivos Específicos**

- Verificar a ocorrência de dimorfismo na espécie *M. polymorphosporus* e otimizar as condições de crescimento das leveduras;
- Extrair e purificar ácidos siálicos de formas micelianas em diferentes espécies de *Mucor*;
- Caracterizar ácidos siálicos por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS);
- Evidenciar a localização dos ácidos siálicos nas diferentes formas de *M. polymorphosporus*, através do uso de lectinas que apresentam especificidade para ácidos siálicos;
- Avaliar a presença de sialoglicoproteínas em micélio de *M. polymorphosporus* por meio de Western Blotting;
- Verificar a importância dos ácidos siálicos quanto à contribuição com carga negativa à superfície celular fúngica, através da interação de conídios e leveduras de *M. polymorphosporus* ao substrato catiônico poli-L-lisina;
- Avaliar o possível papel de ácidos siálicos de *M. polymorphosporus* na interação de conídios (tratados ou não com sialidase) com neutrófilos e monócitos humanos.
- Identificar e caracterizar parcialmente as atividades peptidásicas extracelulares das diferentes formas de *M. polymorphosporus*, quanto à especificidade ao substrato, pH ótimo, tempo de digestão enzimática, além da sensibilidade à inibidores específicos;

# **MATERIAL E MÉTODOS**

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Fungos

Diferentes espécies do gênero *Mucor* foram utilizadas neste trabalho (Tabelas 1 e 2). Todas as amostras foram gentilmente cedidas pela Profa Galba M<sup>a</sup> de Campos-Takaki da Universidade Federal de Pernambuco, as quais foram mantidas a 4°C em meio Sabouraud-dextrose sólido (ágar inclinado), com repiques trimestrais.

**Tabela 1: Isolados do gênero *Mucor* da micoteca da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)**

Código da Amostra	Espécie	Origem
URM 480	<i>M. circinelloides f. circinelloides</i>	ATCC 8097
URM 485	<i>M. ramannianus</i>	ATCC 9628
* URM 1044	<i>M. polymorphosporus</i>	Pernambuco, Biópsia de apêndice, 1958.
URM 3087	<i>M. ramosissimus</i>	São Paulo, folha de <i>Albertia myrcifolia</i> , 1989
URM 3232	<i>M. plumbeus</i>	Pará, Castanha do Pará, 1991
URM 3234	<i>M. racemosus f. chibinensis</i>	Pernambuco, Rizosfera de cana de açúcar, 1991.

\* Única espécie utilizada em todos os experimentos.

**Tabela 2: Isolados japoneses do gênero *Mucor* pertencentes ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da UFPE (LIKA)**

Código da Amostra	Espécie
LIKA 0063	<i>M. circinelloides</i>
LIKA 0066	<i>M. circinelloides</i>
LIKA 0067	<i>M. hiemalis</i>
LIKA 0070	<i>M. ramosissimus</i>
LIKA 0072	<i>M.ucedo</i>

**Observação:** Estes isolados foram fornecidos sem a discriminação de suas respectivas origens.

### **3.1.1 – Condições de cultivo:**

Cada isolado foi inoculado em 200 mL de meio quimicamente definido Czapek–Dox pH 6,5 (sacarose 30,0g; NaNO<sub>3</sub> 2,0g; MgSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O 0,5g; KCl 0,5g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8g; FeSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O 0,01g; H<sub>2</sub>O q.s.p. 1000mL) por 10 dias e as formas micelianas foram propagadas em 2 litros do mesmo meio de cultura por 20 dias, à temperatura ambiente, sob agitação. As massas fúngicas foram recuperadas por filtração em filtro sinterizado (Poros G2) para posterior extração química dos ácidos siálicos.

Para a obtenção das formas de conídio da espécie *M. polymorphosporus*, a forma de micélio destes fungos foram semeadas em placas de Petri contendo meio Sabouraud-dextrose sólido. Os conídios foram lavados com salina (solução aquosa de NaCl à 0,85%) e removidos por “raspagem” com auxílio de uma alça, após 05 dias de crescimento fúngico à temperatura ambiente.

### **3.1.2 – Obtenção das formas de levedura em *M. polymorphosporus*:**

As leveduras foram obtidas através da modificação da metodologia descrita por BARTINICK-GARCIA (1968b), que relatava a necessidade da incubação do fungo inoculado em placas de petri contendo Sabouraud sólido em jarras de anaerobiose (sistema Gas-Pak), por 24-48h a 37°C. No entanto, no presente trabalho as leveduras foram obtidas após inoculação de uma suspensão de  $10^7$  conídios em erlenmeyer de 50mL contendo 50 mL de meio Sabouraud líquido (condições microaerófilas) por um período mínimo de 12 horas de incubação a temperatura ambiente.

### **3.2 - Extração e purificação de ácidos siálicos (REUTER & SCHAUER, 1994)**

A massa miceliana de cada um dos 11 isolados foi suspensa em 50 mL de água destilada e o pH foi ajustado a 2,0 com ácido fórmico 50% (v/v). A suspensão foi incubada por 1 hora a 70°C. A mistura foi resfriada em gelo e então centrifugada a 8000 rpm por 15 min. O sobrenadante, contendo os ácidos siálicos liberados, foi removido e o sedimento suspenso em 50 mL de água destilada tendo seu pH ajustado a 1,0 com ácido clorídrico 3 M. Depois de 1 hora de incubação a 80°C, a suspensão foi resfriada e centrifugada como descrito anteriormente. Os sobrenadantes foram combinados e submetidos à ultracentrifugação (50.000 x g / 30 min / 4°C) e a separação do material macromolecular foi feita pelo sistema de micropartição Centricon 3 (Amicon). Para iniciar a purificação dos ácidos siálicos, foi realizada cromatografia de troca catiônica em Dowex 50Wx8 (100-200 mesh, Bio-Rad), seguida de cromatografia de troca aniônica em Dowex 1x8 (100-200 mesh, Bio-Rad), sendo a última de crucial importância na purificação de açúcares ácidos. Finalmente, as amostras foram submetidas à gel-filtração em BioGel P-2 (ultrafino, Bio-Rad - coluna de 100 x 0,5 cm). A eluição foi feita

com ácido acético 0,01 M e os ácidos siálicos foram detectados por HPTLC e GC-MS, além de serem quantificados por dosagem química, conforme descrito nos itens posteriores.

### **3.3 - Identificação de ácidos siálicos por cromatografia em camada fina de alta resolução (HPTLC)**

Os ácidos siálicos foram analisados por HPTLC em placas de sílica utilizando-se como solvente de corrida uma mistura contendo *n*-propanol, hidróxido de amônio 1 M e água (6:2:1 v/v/v). As bandas foram visualizadas pela aplicação do reagente resorcinol-ácido clorídrico. As amostras foram então comparadas quanto ao seu  $R_f$  e coloração característica com os padrões dos ácidos *N*-acetilneuramínico e *N*-glicolilneuramínico utilizados na concentração de 1 mg / mL (REUTER & SCHAUER, 1994).

### **3.4 - Análise de ácidos siálicos por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)**

Uma mistura de piridina / bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) 1:1 (v/v) foi adicionada às amostras de ácidos siálicos purificadas por 1 hora à temperatura ambiente. As amostras foram injetadas em cromatógrafo gás-líquido acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu (GCMS-QP5000) equipado com coluna capilar DB1 (30 m x 0.25 mm), programado com a temperatura inicial de 120<sup>0</sup>C durante 10 min, alcançando a temperatura final de 280<sup>0</sup>C (2<sup>0</sup>C/min). A temperatura do injetor foi mantida a 250<sup>0</sup>C e a temperatura de interface a 230<sup>0</sup>C. Os derivados dos ácidos siálicos foram identificados pelo tempo de retenção e através dos espectros de massa obtidos por impacto de elétrons (energia de ionização de 70eV, corrente 100 $\mu$ A, temperatura de

220<sup>0</sup>C) tomando como comparação o ácido *N*-acetilneuramínico (Sigma Chem. Co), padrão submetido às mesmas condições que as amostras estudadas.

### **3.5 - Quantificação de ácidos siálicos por dosagem química**

Os ácidos siálicos purificados foram quantificados pelo método do ácido tiobarbitúrico-ácido periódico (Warren, 1959). O volume de 20 µL do reagente 1 (75 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentrado; 5,6 g de H<sub>5</sub>IO<sub>6</sub> e água q.s.p. 100 mL) foi adicionado ao volume final de 100 µL da solução a ser quantificada e esta solução foi homogeneizada e incubada por 30 min a 37<sup>0</sup>C. A seguir foram adicionados 200 µL do reagente 2 (5 g de NaAsO<sub>2</sub>; 7,1 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e água q.s.p. 100 mL) e a solução então agitada vigorosamente até o desaparecimento da coloração amarelada. Em seguida, o volume de 200 µL do reagente 3 (0,9 g de ácido tiobarbitúrico, 7,1 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e água q.s.p. 100 mL) foi adicionado e a solução homogeneizada incubada por 15 min a 96<sup>0</sup>C, e a seguir resfriada em banho de gelo por 5 min. Posteriormente, foram adicionados 700 µL de *n*-butanol, seguindo-se de agitação vigorosa e centrifugação por 5 min a 1500 rpm. A densidade óptica da fase superior, obtida após a centrifugação, foi lida em espectrofotômetro (Beckman Coulter DU530) no comprimento de onda de 549 nm. Uma solução padrão de ácido *N*-acetilneuramínico (0,3mg/mL) foi utilizada na faixa de concentração de 1,5 a 6,0 µg.

### **3.6 - Interação com lectinas**

Para o reconhecimento de resíduos terminais de ácidos siálicos foram utilizadas lectinas como *Limulus polyphemus* (LPA), além das lectinas SNA (especificidade α2,6

sialil-galactosil) e MAA (especificidade  $\alpha$ 2,3 sialil-galactosil). Controles para a ligação dos ácidos siálicos com resíduos subterminais de galactose também foram efetuados através da utilização da lectina *Arachis hypogaea* (PNA) após o tratamento com sialidase.

### **3.6.1 - Evidenciação por microscopia de fluorescência**

As formas de micélio, conídios e leveduras da espécie *M. polymorphosporus* foram fixadas em PBS (tampão fosfato 0,01 M; 0,15 M NaCl), pH 7,2 contendo 4% (v/v) de paraformaldeído. Para avaliar a especificidade de ligação ao ácido siálico, as células foram pré-tratadas com sialidase de *Vibrio cholerae* (0.2U/ mL), por 2 horas à 37° C. Após a fixação, estas foram lavadas com PBS e incubadas com as diferentes lectinas conjugadas à isotiocianato de fluoresceína (FITC) na concentração de 20  $\mu$ g/ml, por 1 hora à temperatura ambiente. Após esta incubação, a suspensão celular foi lavada e colocada na proporção de uma parte de amostra para duas de azul de Evans (0,1%) em lâminas de vidro para posterior observação em microscópio de fluorescência Zeiss (Axioplan).

### **3.6.2 - Evidenciação por citometria de fluxo**

As leveduras e os conídios da espécie *M. polymorphosporus* ( $10^6$  células/ mL) foram fixados em PBS pH 7,2 contendo 4% (v/v) de paraformaldeído. Após a fixação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e incubadas com as lectinas-FITC, nas condições utilizadas no item 3.6.1. As células foram lavadas em PBS e analisadas em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson) equipado com laser de argônio de

15 mW emissor em comprimento de onda de 488 nm. Células fúngicas não marcadas foram utilizadas como controle para determinação do tamanho e da autofluorescência das formas fúngicas analisadas (RODRIGUES *et al.*, 1997).

### **3.7 - Análise de sialoglicoproteínas por Western Blotting**

Aproximadamente 1g (peso úmido) da massa de micélio foi lisada com pérolas de vidro em “Bead Beater” (tipo 853023/8; B. Braun Biotech International, Germany), por 10 ciclos de 2 minutos. As pérolas de vidro foram removidas e a suspensão centrifugada (2,000 x g / 10 minutos / 4° C). O sobrenadante rico em proteína foi quantificado pelo método de Lowry (LOWRY, 1951) e uma alíquota desta extração, correspondendo a 20 µg de proteína, foi submetida ao processo de eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (4° / 120v / 1h). A massa molecular dos polipeptídeos da amostra foi calculada através da mobilidade eletroforética dos padrões de massa molecular (GIBCO BRL, Grand Island, N.Y.,USA). Os extratos protéicos foram corados com prata ou transferidos para membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas em uma solução contendo 150 mM NaCl, 10 mM de Tris pH 7.5 e 10% de Tween 20 por 2h à temperatura ambiente, seguindo-se da incubação com as lectinas SNA e MAA (detecção de sialoglicoconjugados), além da lectina *Concanavalia ensiformis*, Con A (detecção de glicoconjugados contendo resíduos de manose e glicose) marcadas com peroxidase na concentração de 1 µg/mL, por 1h à temperatura ambiente. Visando confirmar a especificidade de interação com as lectinas, membranas-controle contendo os extratos protéicos foram submetidas a um pré-tratamento com periodato (Arduino *et al.*, 1994). A membrana foi tratada com 10 mM de

---

NaIO<sub>4</sub> em 0.05 M de tampão acetato de sódio, pH 5.0, por 2h à 4°C. Após as lavagens (5x) com água destilada, o produto da oxidação foi reduzido com uma solução contendo 10 mg de NaBH<sub>4</sub> em tampão Borato de Sódio 0.2 M, pH 8.2 por 3h à 4° C e, então lavada com água destilada para posterior incubação com as lectinas específicas para ácido siálico. A fetuína foi usada para o controle da eficiência da reação de oxidação do periodato. Finalmente, a marcação das sialoglicoproteínas foi procedida através da lavagem da membrana (5x) em solução de bloqueio, seguindo-se da detecção de quimioluminescência ou reação com 0.5 mg/mL de diaminobenzidina (DAB) em tampão Tris-HCl 1.5 M, pH 7.4, suplementado com 0.01% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O desenvolvimento da cor foi interrompido pela imersão da membrana em água destilada.

### **3.8 - Adesão à Poli-L-lisina**

Conídios tratados e não-tratados com sialidase foram lavados 2x com PBS 0.01 M (pH 7.2), contados e ajustados para  $2.5 \times 10^6$  células / mL e 100 µL desta suspensão foi aplicado em lamínulas pré-revestidas com poli-L-lisina (0.1%) dispostas em placas de 24 poços. Após 1h de incubação, os conídios não-aderidos foram descartados por lavagem (2x) com PBS e então fixados (2mL) com solução de PBS contendo 2.5% (v/v) de glutaraldeído. A avaliação do índice de adesão foi feita em microscópio óptico (x400) pela contagem do número de células aderidas em 5 campos aleatórios, em grupos de triplicata para cada condição experimental. Os resultados foram expressos através da média dos percentuais de células aderidas por poço em 03 experimentos independentes realizados em triplicata.

### **3.9 - Influência de ácidos siálicos na interação dos conídios de *M. polymorphosporus* com monócitos e neutrófilos humanos**

Ensaio de fagocitose foram realizados usando o substrato ester acetoximetil 2',7'-bis-(carboxietil)-5(6')-carboxifluoresceína (BCECF/AM), como descrito previamente (SCHNITZLER *et al.*, 1999; ALVIANO *et al.*, 2004b). Resumidamente, os conídios foram incubados com BCECF/AM (concentração final de 1 µmol/mL) por 30 min à 37 °C. As células fúngicas foram então exaustivamente lavadas com PBS, contadas em câmara de Neubauer e 5x10<sup>6</sup> conídios foram incubados com 1 mL de sangue heparinizado (10 IU/ mL), obtido de doadores saudáveis, à 37 °C sob agitação.

Após 15, 30 e 60 min, alíquotas de 100 µL foram retiradas e misturadas com 0.9 mL de tampão de lise (por litro: NH<sub>4</sub>C 9g, KHCO<sub>3</sub> 1g, EDTA 37 mg, pH 7.3), para eliminar a interferência dos eritrócitos. Os sedimentos após serem lavados, foram ressuspensos em 500 µl de PBS e analisados imediatamente por citometria de fluxo utilizando o software Cellquest (Becton Dickinson, version 3.1.f), usando os parâmetros como descrito anteriormente (SCHNITZLER *et al.*, 1999; ALVIANO *et al.*, 2004b). Os monócitos e os neutrófilos foram localizados e selecionados através da observação de dois diferentes parâmetros (tamanho e complexidade intracelular), possibilitando assim mensurar a interação dos conídios com as respectivas células fagocíticas através da análise e quantificação do parâmetro de intensidade de fluorescência. As associações dos neutrófilos e monócitos com os conídios tratados com BCECF, foram expressas como o aumento de emissão de fluorescência pelos fagócitos em relação ao sistema-controle contendo monócitos e neutrófilos sem nenhum tratamento. Amostras representativas utilizadas nas análises de citometria de fluxo foram observadas quanto

à fluorescência em microscopia de contraste interferencial (Zeiss microscópio-Axioplan 2).

### **3.10 - Determinação de atividade peptidásica secretada nas diferentes formas de *M. polymorphosporus***

#### **3.10.1.- Efeito do pH na atividade peptidásica**

Para avaliar o efeito do pH na atividade peptidásica, os sobrenadantes de cultivo concentrados de micélio e levedura de *M. polymorphosporus*, ScM (aproximadamente 5 µg de proteínas) e ScL (aproximadamente 10 µg de proteínas), respectivamente foram incubados na ausência ou presença de BSA (2 µg) como substrato protéico solúvel. Os diferentes sistemas foram incubados em um volume final de 100 µl com os seguintes tampões: KCl-HCl 0.2 M, pH 1,0; Citrato de Sódio 0,2 M, pH 2,0 / 3,0 / 4,0 / 5,0; Fosfato de Sódio 50 mM, pH 6,0; Tris-HCl 0,25 M, pH 7,2 / 8,0 e Glicina-NaOH 20 mM, pH 9,0 / 10,0 / 11,0 por 5 h à 37°C. Após incubação, os meios de reações foram concentrados através de “speed vac” e a presença de atividade enzimática detectada em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) através da visualização da degradação do substrato protéico (LAEMMLI, 1970). Concomitantemente, ensaios de dosagem química da atividade peptidásica em diferentes valores de pH foram realizados conforme descrito no item 3.10.5.

#### **3.10.2. - Atividade peptidásica de ScM frente a diferentes substratos protéicos**

Os sobrenadantes concentrados de *M. polymorphosporus* foram incubados na ausência ou presença dos seguintes substratos protéicos a 5 µg: albumina sérica humana (HSA), laminina humana (LAM) e mucina (MUC). Todos os sistemas foram

ajustados para volume final de 100  $\mu$ l do tampão pH 4,0 e incubados durante 5 h à 37°C. Os fragmentos de hidrólise enzimática foram analisados em SDS-PAGE, como descrito no item 3.10.4.

### **3.10.3 - Efeito de inibidores proteolíticos na atividade peptidásica**

A caracterização parcial das peptidases foi feita através da utilização de diferentes inibidores proteolíticos (Tabela 3). Para tal, os sobrenadantes de cultivo de *M. polymorphosporus* foram incubados com os seguintes inibidores proteolíticos: PMSF a 1mM e 10 mM, 1,10-Fenantrolina 1mM e 10 mM, Pepstatina A 1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M. Iodoacetamida a 1 e 10  $\mu$ M e E-64 1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M em um volume final de 100  $\mu$ l dos tampões correspondentes aos valores de pH com melhor atividade peptidásica para cada sobrenadante avaliado. Em seguida, os sistemas depois de concentrados foram analisados através da metodologia descrita no item 3.10.4.

**Tabela 3: Inibidores proteolíticos que foram utilizados.**

<b>Inibidores proteolíticos</b>	<b>Classes-alvo</b>
PMSF	serina e cisteína peptidase
1,10-Fenantrolina	metalo peptidase
E-64	cisteína peptidase
Pepstatina A	aspártico peptidase
Iodoacetamida	cisteína peptidase
TLCK	serina peptidase

---

#### **3.10.4 - Análise dos fragmentos de hidrólise enzimática dos substratos protéicos por SDS-PAGE**

A identificação das atividades peptidásicas secretadas de *M. polymorphosporus* foi realizada em SDS-PAGE através da análise dos fragmentos de hidrólise dos substratos protéicos. Os diferentes sistemas confeccionados (itens 3.10, 3.11 e 3.12) foram aplicados em gel de SDS a 12% (gel de empacotamento 3%) (LAEMMLI, 1970). A eletroforese foi processada a 120 V, à 4°C. As proteínas foram reveladas através da impregnação dos géis com prata (BLUM, BEIER & GROSS, 1987).

#### **3.10.5 - Dosagem química da atividade peptidásica secretada nas diferentes formas de *M. polymorphosporus* (BUROKER-KILGORE & WANG, 1993/ adaptado)**

Para quantificar a atividade peptidásica secretada, os sobrenadantes concentrados (ScM e ScL) de *M. polymorphosporus* foram adicionados a uma solução de BSA a 1mg/mL (concentração final de 2 µg), e o volume da reação completado para 100 µl com diferentes soluções tampões (descrito no item 3.10.1). Em seguida, os

absorbância do teste. Todos os sistemas reacionais e os controles foram preparados em triplicatas. A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar um aumento de 0,001 unidade na absorbância.

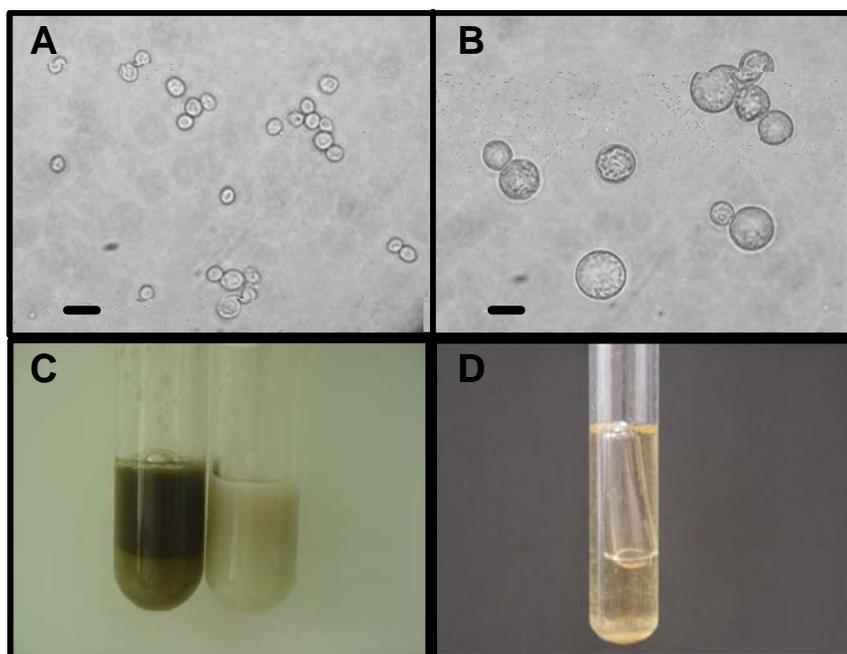
### **3.10.6. - Análise estatística**

O erro padrão foi calculado através da média dos experimentos. O nível de significância das diferenças entre as médias foi analisado estatisticamente pelo teste *t* de Student. Valores de *P* menores que 0,05 foram considerados significativos.

# RESULTADOS

#### 4 – RESULTADOS

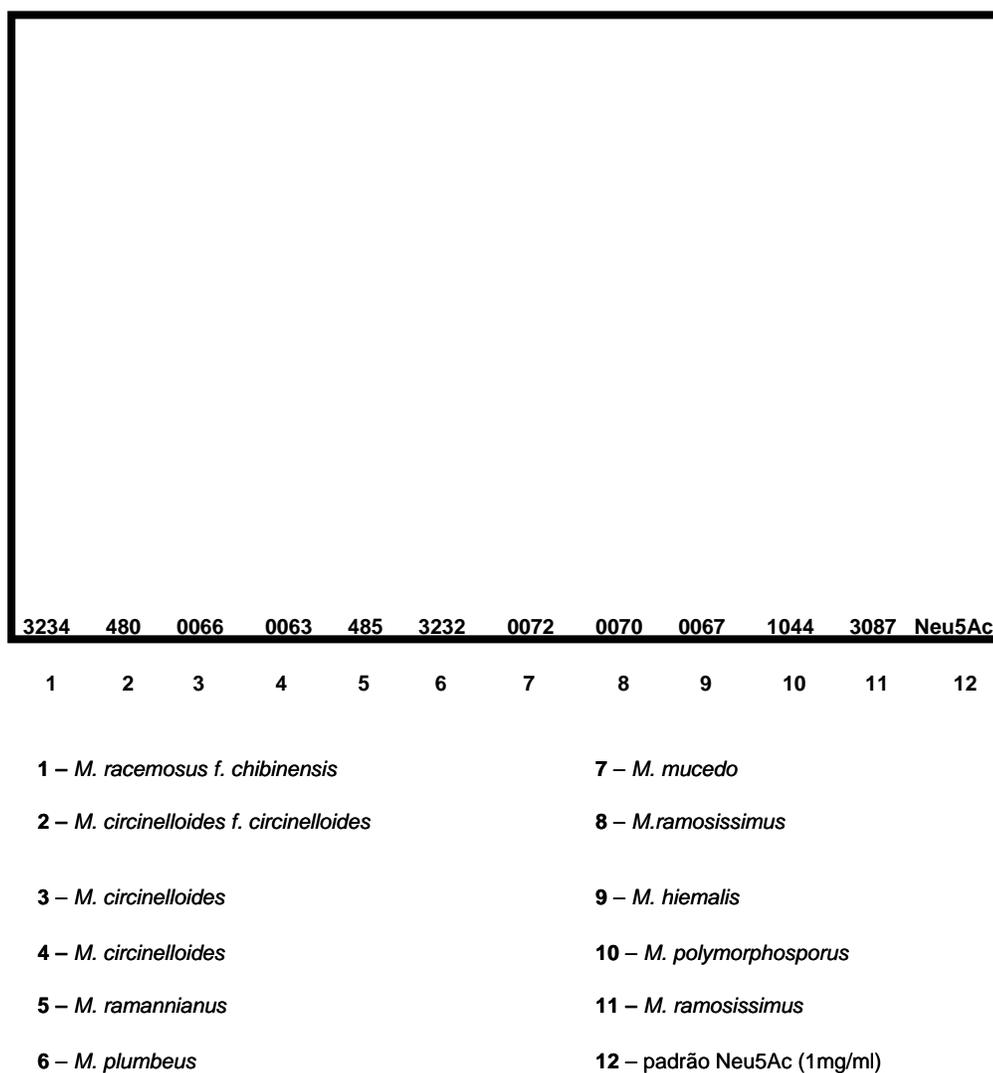
A obtenção das formas de levedura, através do cultivo em meio Sabouraud-líquido sob condições microaerófilas pode ser observada na figura 5. Os experimentos demonstraram a diferenciação da forma de conídio (5A) para a forma de levedura (5B) num período de, aproximadamente 12 horas após a inoculação, onde pode ser observada uma nítida diferença em aspectos como o tamanho (transição média de 5,0 para 10,0  $\mu\text{M}$ ), aspecto microscópico das células (de eletrólúcidas para eletrondensas), bem como despigmentação (5C) e produção de gás (5D).



**Figura 5:** Obtenção de levedura de *M. polymorphosporus*. (A) Conídios e (B) Leveduras, com a barra representando 10 $\mu\text{m}$ . Na figura C, observa-se a presença de melanina nos conídios (à esquerda) e ausência do pigmento em leveduras (à direita) e em D evidencia-se a intensa produção de gás característica das formas de levedura do gênero *Mucor*.

Com relação aos experimentos de identificação de ácidos siálicos, após os procedimentos de extração e purificação, foi realizada uma cromatografia em camada fina de alta resolução (HPTLC), para o monitoramento da eficácia dos procedimentos,

sendo possível através desta técnica a visualização de bandas arroxeadas com os  $R_{fs}$  semelhantes ao padrão de ácido *N*-acetilneuramínico (Figura 6).



**Figura 6:** Cromatografia em camada fina de alta resolução (HPTLC) dos extratos de micélio purificados contendo ácidos siálicos das 11 amostras do gênero *Mucor*

Como forma de confirmar a especificidade das bandas detectadas, foi realizada uma dosagem química para ácidos siálicos, conforme descrita por Warren (1959).

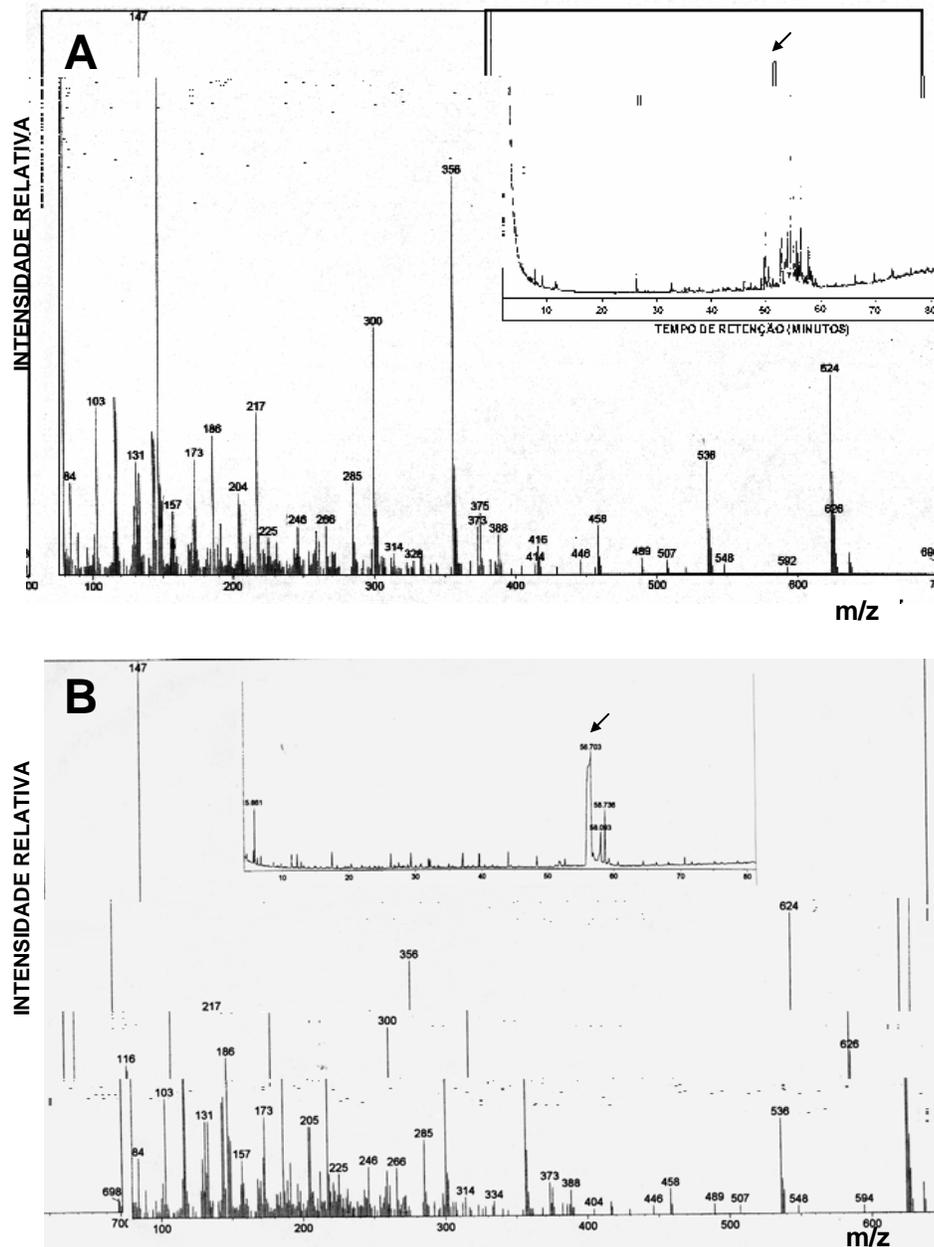
Como demonstrado na tabela 4, através desta técnica foi possível assegurar a eficiência das etapas preliminares de purificação (Tabela 4).

**Tabela 4: Quantificação de ácidos siálicos purificados dos diferentes isolados do gênero *Mucor***

Código da Amostra	Espécie	Teor de ácido siálico em $\mu\text{g}$ por mg de massa fúngica (peso seco)
LIKA 0063	<i>M. circinelloides</i>	-*
LIKA 0066	<i>M. circinelloides</i>	0,2 $\mu\text{g}$ /mg
URM 480	<i>M. circinelloides f. circinelloides</i>	0,070 $\mu\text{g}$ /mg
LIKA 0067	<i>M. hiemalis</i>	0,050 $\mu\text{g}$ /mg
LIKA 0072	<i>M. mucedo</i>	0,1 $\mu\text{g}$ /mg
URM 3232	<i>M. plumbeus</i>	-*
URM 1044	<i>M. polymorphosporus</i>	0,044 $\mu\text{g}$ /mg
URM 485	<i>M. ramannianus</i>	0,020 $\mu\text{g}$ /mg
URM 3234	<i>M. racemosus f. chibinensis</i>	0,080 $\mu\text{g}$ /mg
LIKA 0070	<i>M. ramosissimus</i>	-*
LIKA 3087	<i>M. ramosissimus</i>	0,006 $\mu\text{g}$ /mg

- Não foram encontrados ácidos siálicos nos extratos testados.

Após as etapas descritas anteriormente, seguiram-se as avaliações dos purificados pelas técnicas de cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massas (GC-MS) (Figura 7). Através destas foi possível confirmar os resultados



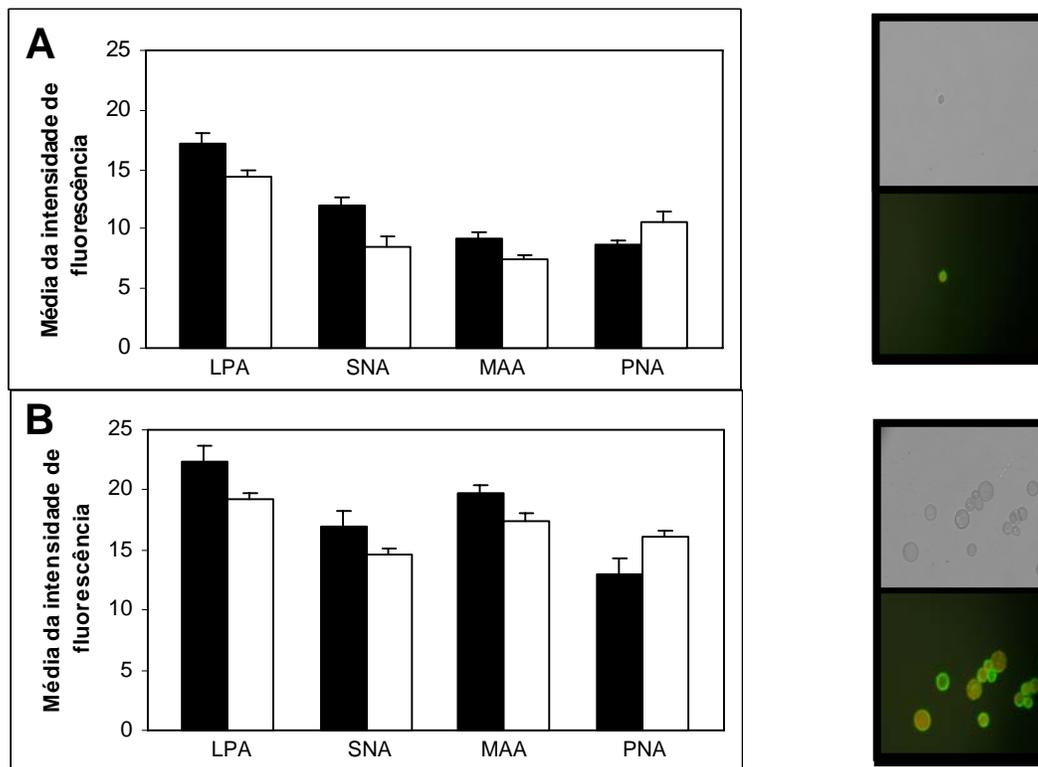
**Figura 7:** GC-MS dos trimetilsilil derivados do padrão de ácido *N*-acetilneuramínico (Sigma Chem.Co) (A) e do ácido *N*-acetilneuramínico componente da espécie *M. polymorphosporus* (B), mostrando o perfil cromatográfico desse ácido siálico em coluna DB1 (figura inserida) e o espectro de fragmentação do ácido *N*-acetilneuramínico (fragmentos característicos: 173; 205; 356; 373; 458; 536 e 624 m/e). Resultados similares também foram obtidos com as amostras *M. polymorphosporus*, *M. ramannianus*, *M. racemosus*, *M. hiemalis*, *M. mucedo*, *M. ramosissimus* (URM 3087) e *M. circinelloides* (URM 480 e LIKA 0066).

---

obtidos por HPTLC, permitindo inclusive a caracterização do ácido *N*-acetilneuramínico em 8 dos 11 isolados: *M. polymorphosporus*, *M. ramannianus*, *M. racemosus*, *M. hiemalis*, *M. mucedo*, *M. ramosissimus* (URM 3087) e *M. circinelloides* (URM 480 e LIKA 0066).

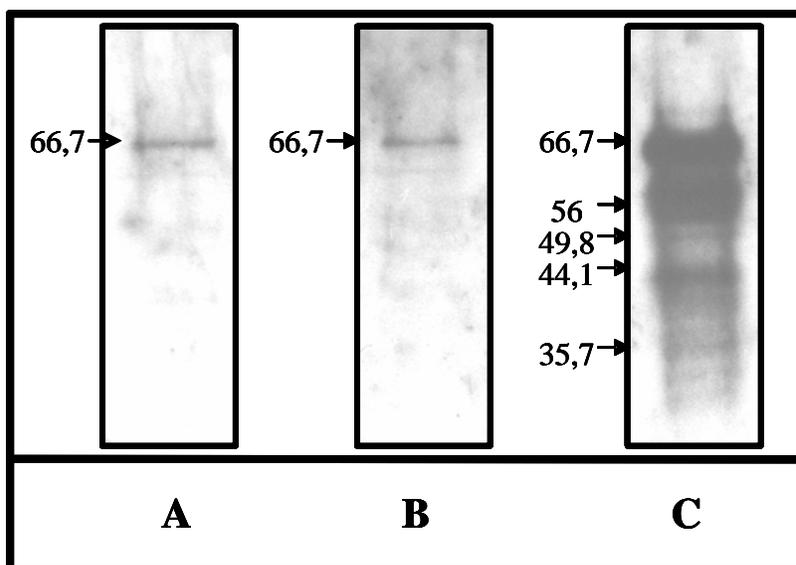
Três dos 11 isolados que foram submetidos à extração de ácidos siálicos e posteriormente purificados conforme a metodologia descrita no material e métodos, apresentaram resultados negativos. Os 3 isolados: *M. plumbeus*, *M. ramosissimus* (LIKA 0070) e *M. circinelloides* (LIKA 0063), não apresentaram ácidos siálicos em nenhuma concentração que pudesse ser detectada pelas técnicas analíticas utilizadas neste trabalho, mesmo depois de se utilizar o triplo da massa fúngica para a extração.

A análise por microscopia de fluorescência foi realizada para a observação da distribuição dos ácidos siálicos na superfície das diferentes formas de *M. polymorphosporus*. As formas de conídios e leveduras foram analisadas, inclusive pela técnica de citometria de fluxo e o perfil de marcação para as lectinas utilizadas foi semelhante entre as formas de conídio e levedura, inclusive no aspecto da diminuição na marcação pelas lectinas LPA, SNA e MAA, após o tratamento com sialidase. Em adição, foi observado que nos dois grupos de células testados apenas a marcação com a lectina PNA aumentou após o tratamento com sialidase, lectina esta responsável pelo reconhecimento de resíduos de galactose, demonstrando a presença de ácidos siálicos também nestas formas fúngicas, formando ligações com resíduos subterminais de galactose (Figura 8).



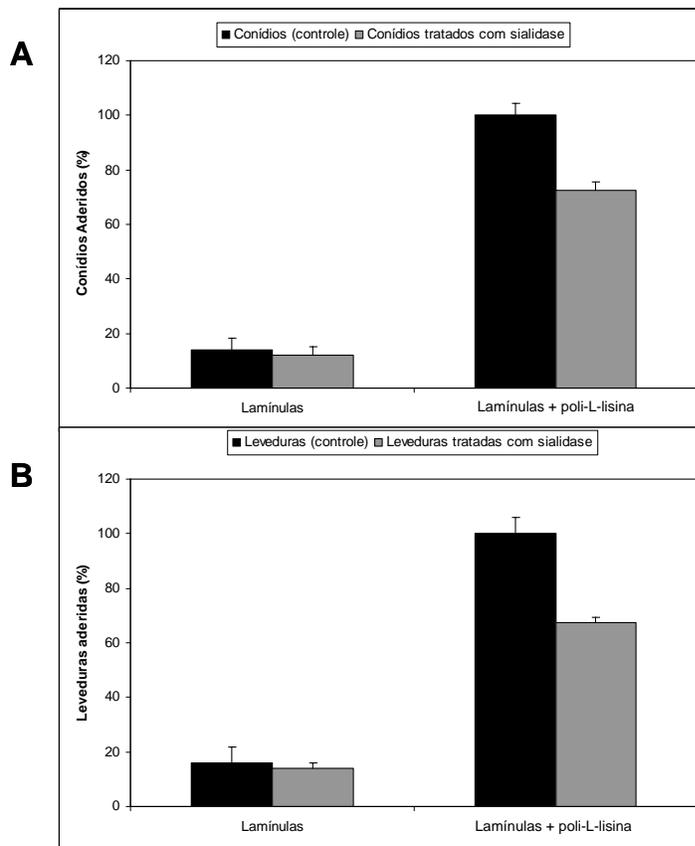
**Figura 8:** Expressão de ácidos siálicos na superfície de conídios (A) e leveduras (B) de *M. polymorphosporus*. As células foram diretamente incubadas com as lectinas LPA, SNA, MAA ou PNA (barras pretas) ou mediante o pré-tratamento com sialidase (barras brancas). A média de intensidade de fluorescência foi calculada e avaliada quanto ao grau de significância através do teste de *t* de Student. O tratamento com sialidase reduziu a intensidade de fluorescência para as lectinas LPA, SNA e MAA, enquanto que aumentou para o tratamento com PNA (análise entre os grupos de células isoladamente).  $P < 0.05$ . À direita dos gráficos estão representadas as microscopias de campo claro e de fluorescência das respectivas formas fúngicas após a marcação com a lectina LPA.

Para detecção de sialoglicoproteínas, foi utilizada apenas a forma de micélio. Na figura 9 é possível observar a presença de uma banda de, aproximadamente 66,7 kDa, tanto na marcação com SNA quanto com MAA, ao passo que na marcação para a lectina ConA (reconhecimento de resíduos de manose e glicose) observa-se uma intensa marcação principalmente para as 5 bandas em destaque (setas) com as suas respectivas massas moleculares.



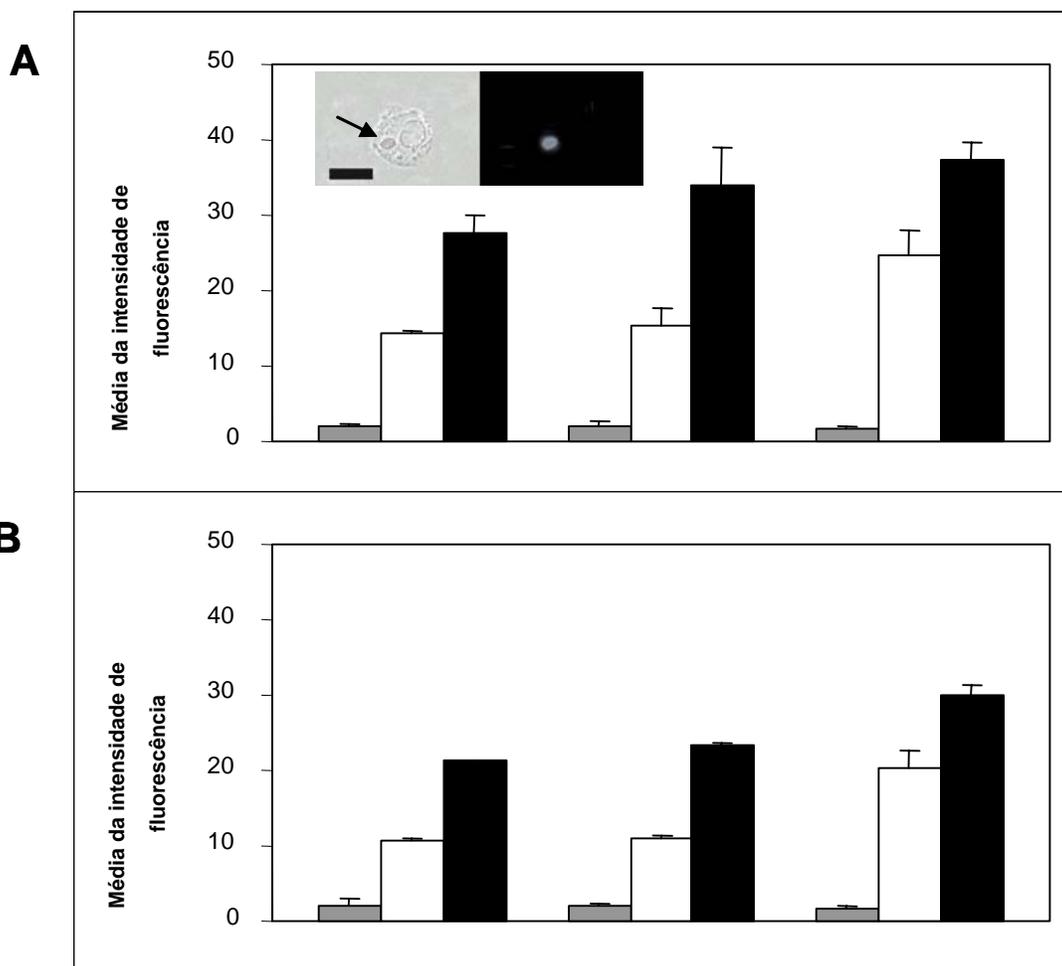
**Figura 9:** Detecção de sialoglicoproteínas em micélio de *M. polymorphosporus*. As proteínas após serem eletrotransferidas para a membrana de nitrocelulose foram incubadas com as lectinas SNA (A), MAA (B) e Con A (C). O pré tratamento das membranas com Periodato de Sódio aboliu a interação com as lectinas (dado não-mostrado)

Após a detecção de ácidos siálicos nas diferentes formas de *M. polymorphosporus*, as análises seguiram com o objetivo de investigar a contribuição destes açúcares para a carga negativa na superfície celular de conídios e leveduras. Na figura 10, é possível notar a adesão tanto nas formas de conídio quanto nas leveduras ao substrato catiônico de poli-L-lisina, somando-se à sensibilidade ao tratamento com sialidase. Os índices de adesão ao substrato tanto em conídios quanto em leveduras mostraram-se dependentes de uma interação mediada por cargas negativas, uma vez que os controles inespecíficos de adesão (lamínulas sem poli-L-lisina) não foram estatisticamente relevantes.



**Figura 10:** Índice de adesão de conídios (A) e leveduras (B) de *M. polymorphosporus* à poli-L-lisina. As barras pretas representam as células fúngicas não-tratadas e as barras cinzas representam as células tratadas com sialidase. O grupo de barras à esquerda representa o índice de adesão dos sistemas efetuados na ausência do substrato catiônico. A verificação da adesão foi realizada microscopicamente pela contagem do número de células aderidas em cinco campos aleatórios (aumento de 400 x) em triplicata para cada condição experimental. A porcentagem de células aderidas por poço foi determinada e analisada estatisticamente pelo teste de *t* de Student. O tratamento com sialidase reduziu a adesão celular ao substrato catiônico ( $P < 0.05$ ).

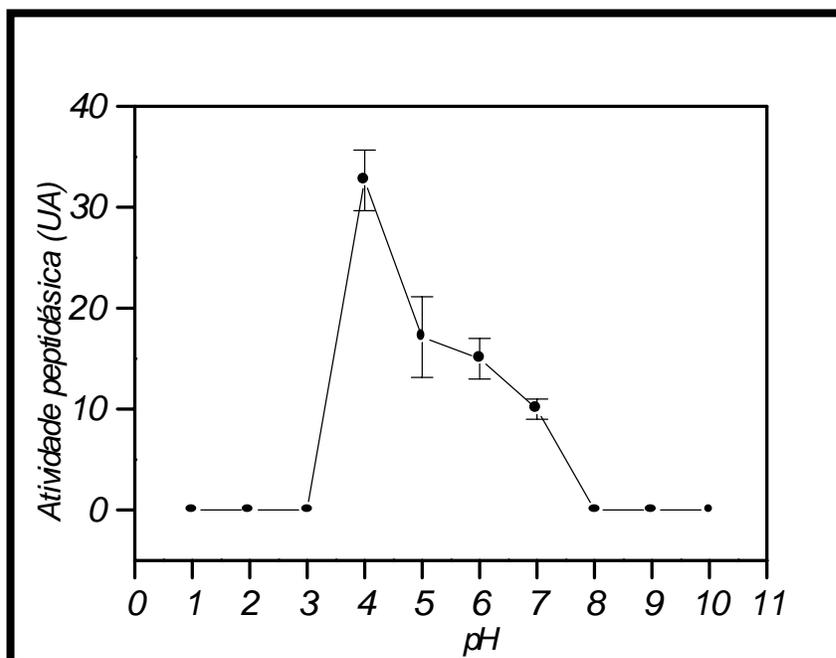
Como forma de verificar a relevância destes ácidos siálicos da superfície celular de conídios para interação com as células do hospedeiro, foram efetuados ensaios de fagocitose utilizando sangue humano heparinizado (Figura 11). O perfil médio de internalização das células fúngicas comparando-se duas linhagens de fagócitos presentes no sangue, monócitos e neutrófilos, demonstrou maior internalização dos conídios pelo primeiro grupo de células com o aumento deste índice ao longo dos tempos testados. Em ambos os grupos de células sanguíneas, o pré-tratamento dos conídios com sialidase aumentou significativamente os índices de fagocitose.



**Figura 11:** Índice de fagocitose de conídios de *M. polymorphosporus* por monócitos (A) e neutrófilos humanos (B). Conídios-controle (barras brancas) ou tratados com sialidase (barras pretas), foram previamente marcados com BCECF/AM. As barras cinzas representam o nível de “Burst Oxidativo”, mediante a marcação das células sanguíneas com DHR 123. Os níveis de associação fúngica foram expressos através da intensidade relativa da fluorescência de monócitos e neutrófilos, após a incubação com os conídios. O tratamento com sialidase tornou os conídios significativamente mais susceptíveis à fagocitose, em ambos os grupos celulares ( $P < 0.05$ ). A figura inserida representa a internalização do conídio (seta) pelos fagócitos em microscopia de contraste interferencial (à esquerda) e microscopia de fluorescência (à direita).

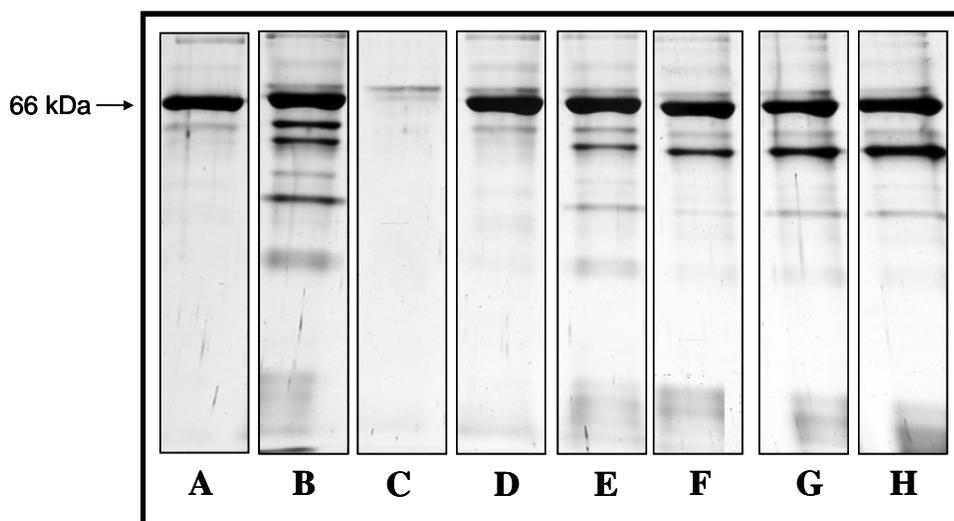
Com objetivo de atribuírmos outro possível fator de virulência em *M. polymorphosporus*, a segunda parte do estudo enfoca a detecção de peptidases nos sobrenadantes de cultivo de micélio (ScM) e de levedura (ScL). Primeiramente, foi avaliado o perfil de atividade peptidásica do ScM em diferentes valores de pH (Figura

12). Na ampla faixa dos pHs testados, foi observada predominância de atividade do pH ácido ao neutro, com pico ótimo em pH 4,0.



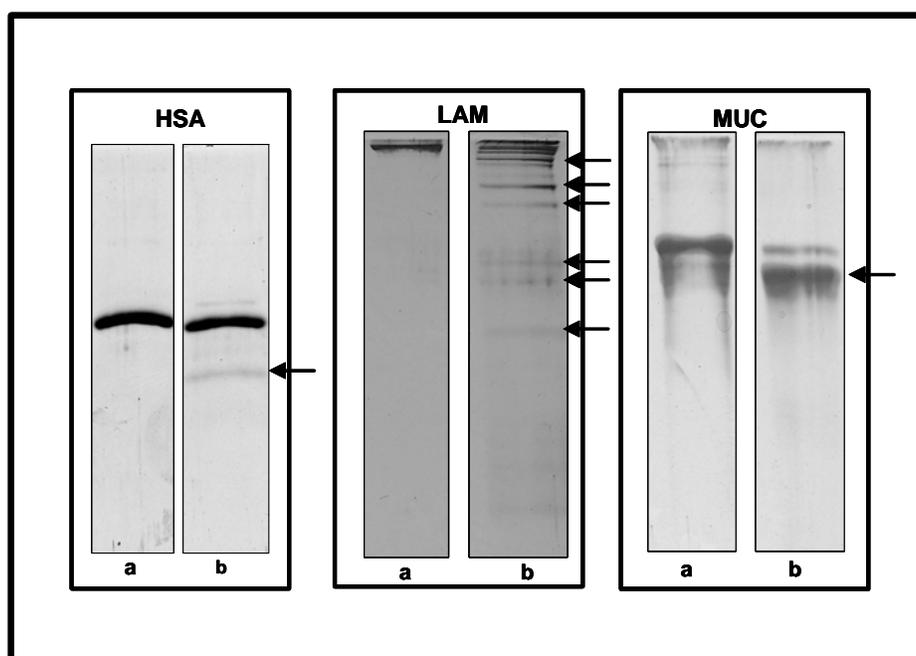
**Figura 12:** Efeito do pH na atividade peptidásica do sobrenadante de cultivo de micélio de *M. polymorphosporus*. O ScM foi incubado com BSA por 1 h a 37°C em tampões com valores de pH variando do 1,0 – 11,0. Os valores da atividade peptidásica, expressos em unidades arbitrárias (UA), representam as médias  $\pm$  erro padrão de três experimentos diferentes, realizados em triplicata.

Com a finalidade de caracterizar a classe dessas peptidases secretadas para o meio extracelular, o sobrenadante de micélio de *M. polymorphosporus* foi incubado com BSA na ausência ou presença de diferentes inibidores proteolíticos. Os resultados sugerem que a atividade de ScM em pH 4,0 seja referente predominantemente a(s) aspártico(s) peptidase(s), uma vez que a hidrólise do BSA, foi completamente inibida por pepstatina A (Figura 13, linha D), seguindo-se de inibições parciais por 1,10-fenantrolina, E-64, iodoacetamida e PMSF, que são inibidores de metalo, cisteína, cisteína e serina/cisteína peptidases, respectivamente (Figura 13, linhas F, H, G e E).



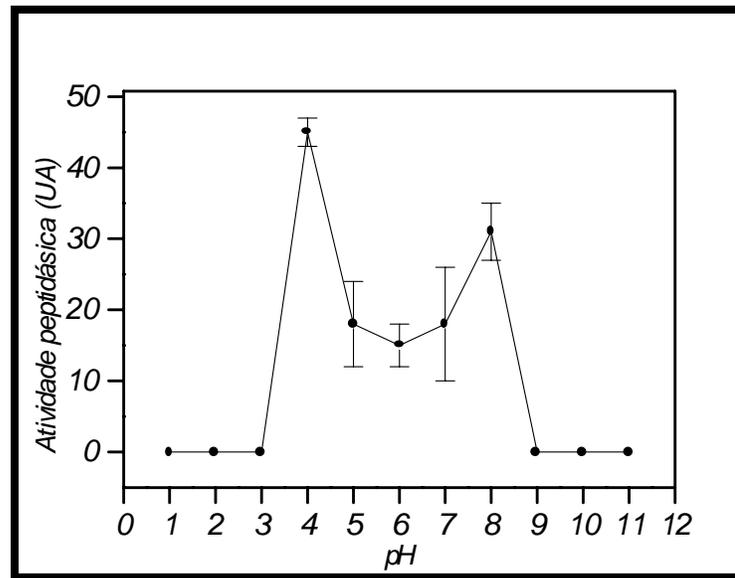
**Figura 13:** Efeito de inibidores proteolíticos na atividade peptidásica do sobrenadante de cultivo de micélio (ScM) de *M. polymorphosporus* em pH 4,0. (A) Controle BSA íntegro; (B) Atividade peptidásica do ScM; (C) Controle ScM; (D) pepstatina A a 1  $\mu$ M; (E) PMSF a 1 mM; (F) 1,10-fenantrolina a 1mM; (G) iodoacetamida a 1 $\mu$ M e em (H) E-64 a 1 $\mu$ M.

Para obtermos mais informações a respeito da especificidade da atividade peptidásica secretada em micélio, foi testada sua capacidade de clivar outros substratos protéicos, incluindo uma importante proteína do soro humano (soro albumina humana), o componente de matriz extracelular laminina, além do substrato sialilado mucina. O ScM de *M. polymorphosporus* foi capaz de degradar estes substratos, conforme demonstrado na figura 14.



**Figura 14:** Clivagem de diferentes substratos por ScM de *M. polymorphosporus*. O perfil de degradação foi analisado por SDS-PAGE 12%. (a) controle com cada substrato protéico suplementado apenas com tampão. (b) sobrenadante de cultivo, incubado por 5 h a 37°C, no tampão pH 4,0, com os substratos protéicos soro albumina humana (HSA), laminina humana (LAM) e mucina (MUC). As setas indicam os principais fragmentos decorrentes da hidrólise enzimática.

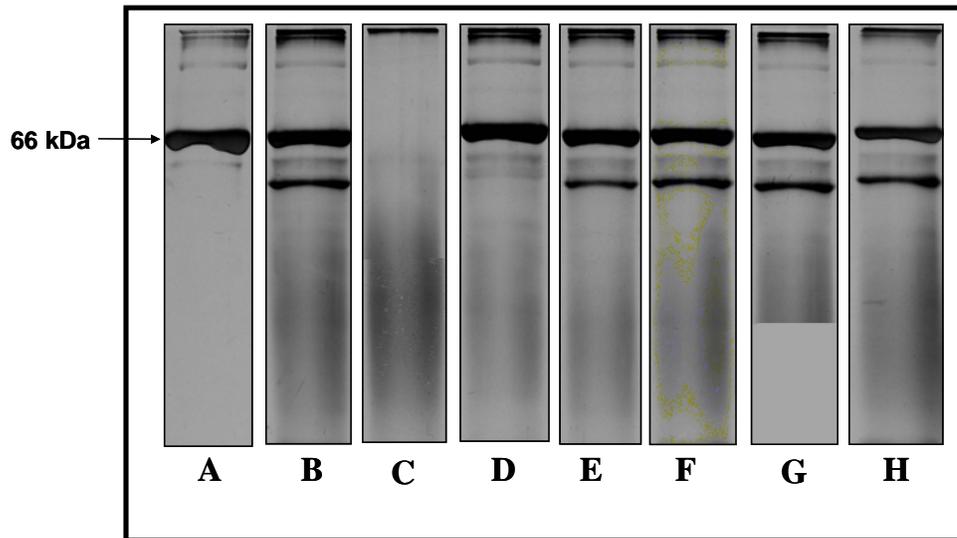
Quanto à avaliação da atividade peptidásica do sobrenadante de cultivo de levedura (ScL) de *M. polymorphosporus*, também foram inicialmente efetuadas dosagens de atividade peptidásica em diferentes valores de pH (Figura 15). Na ampla faixa dos pHs testados, foram observados dois picos ótimos de atividade, um em pH 4,0 seguindo-se de outro em pH 8,0.



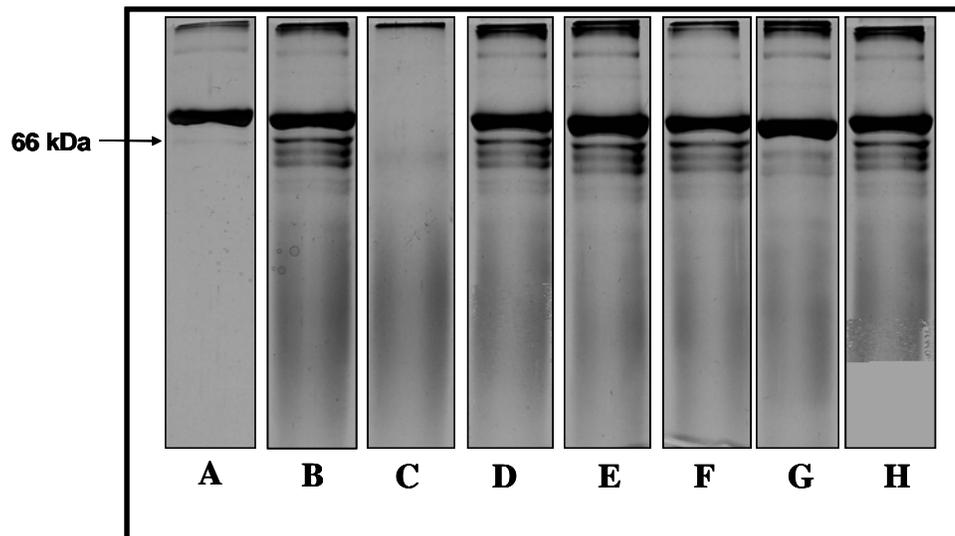
**Figura 15:** Efeito do pH na atividade peptidásica do sobrenadante de cultivo de levedura de *M. polymorphosporus*. O ScL foi incubado com BSA por 1 h a 37°C em tampões com valores de pH variando do 1,0 – 11,0. Os valores da atividade peptidásica, expressos em unidades arbitrárias (UA), representam as médias  $\pm$  erro padrão de três experimentos diferentes, realizados em triplicata.

Com a finalidade de caracterizar a classe dessas peptidases secretadas por levedura para o meio extracelular, o sobrenadante desta forma fúngica, assim como em ScM, foi incubado com BSA na ausência ou presença de diferentes inibidores proteolíticos. Os resultados sugerem que a atividade de ScL em pH 4,0 seja referente a(s) aspártico(s) peptidase(s), uma vez que a hidrólise do BSA, foi completamente inibida por pepstatina A (Figura 16, linha D), e foi constatada ausência de inibição pelos demais inibidores proteolíticos (Figura 16, linhas E, F, G e H). Quanto as inibições em pH 8,0, o perfil foi bastante curioso, ocorrendo inibição apenas para um inibidor de cisteína peptidase iodacetamida (Figura 17, linha G), porém esta mesma atividade não apresentou inibição por outro inibidor da mesma família de peptidases, o E-64 (Figura 17, linha H). Somando-se ao fato que a atividade em pH 8.0 pode ser inibida por TLCK (dado não-mostrado) um

inibidor específico de serina-peptidases, os resultados somados sugerem a presença de uma peptidase do tipo serina nesta atividade do ScL.



**Figura 16:** Efeito de inibidores proteolíticos na atividade de sobrenadante de cultivo de levedura (ScL) de *M. polymorphosporus* em pH 4,0. (A) Controle BSA ; (B) Atividade peptidásica do ScL; (C) Controle ScL; (D) pepstatina A a 1  $\mu$ M; (E) PMSF a 1 mM; (F) 1,10-fenantrolina a 1mM; (G) iodoacetamida a 1 $\mu$ M e em (H) E-64 a 1 $\mu$ M.



**Figura 17:** Efeito de inibidores proteolíticos na atividade de sobrenadante de cultivo de levedura (ScL) de *M. polymorphosporus* em pH 8,0. (A) Controle BSA ; (B) Atividade peptidásica do ScL; (C) Controle ScL; (D) pepstatina A a 1  $\mu$ M; (E) PMSF a 1 mM; (F) 1,10-fenantrolina a 1mM; (G) iodoacetamida a 1 $\mu$ M e em (H) E-64 a 1 $\mu$ M.

## **5- DISCUSSÃO**

Acredita-se que os fungos estejam relacionados essencialmente com o saprofitismo e que a infecção em hospedeiros mamíferos não seria necessária para a sobrevivência de qualquer espécie fúngica. Muitos fatores de virulência são considerados, indubitavelmente, como “acidentes da natureza”, onde o fungo desenvolve o fator não para aumentar a sua virulência em hospedeiros mamíferos, mas sim para aumentar as suas vantagens de sobrevivência como saprófita ou como patógeno. Entretanto, outros fatores de virulência (ex: dimorfismo térmico), não têm função óbvia no ciclo de vida saprofítico e parecem estar envolvidos com a infecção de hospedeiros mamíferos. Enquanto a transmissão direta das micoses é um evento raro para muitos fungos que causam doenças sistêmicas, eventualmente a infecção pode ser fatal, e os fungos ao se replicarem latente ou ativamente podem retornar aos seus ciclos de vida saprofíticos. Diante do exposto, fica claro que pelo menos alguns fatores de virulência fúngicos estão evoluindo e que a visão simplista de que os fungos são estritamente saprófitas provavelmente não é verdadeira (HOGAN, KLEIN & LEVITZ, 1996). Baseado nestas observações têm-se um painel do quão complexo são os componentes e os mecanismos que envolvem a patobiobiologia das infecções fúngicas.

Como dito anteriormente, o fenômeno do dimorfismo têm chamado atenção para o impacto que produz na patogênese fúngica, uma vez que grande parte dos fungos causadores de doenças em humanos são dimórficos (ROONEY & BRUCE, 2002). Orłowski (1991) revisou os aspectos bioquímicos que podem estar implicados com o dimorfismo em *Mucor* sp. Geralmente, o crescimento na forma de levedura necessita de anaerobiose, e da presença de uma hexose fermentável, ao passo que o crescimento na forma filamentosa está associado ao crescimento aeróbico em condições limitantes

---

de nutrientes. Entretanto, um espectro de requerimentos para o dimorfismo são relatados entre as diferentes espécies do gênero. Os requerimentos nutricionais para obtenção das formas de levedura, geralmente são mais específicos que aqueles para a obtenção da forma filamentosa. O crescimento na fase de levedura requer a presença obrigatória de, não somente uma hexose como fonte de carbono e energia, mas também de um composto orgânico aminado como uma fonte de nitrogênio (BARTINICK-GARCIA, 1968; ORLOWSKI, 1991). Muitos esforços estão sendo feitos com objetivo de buscar componentes que consistentemente se correlacionem com o fenômeno do dimorfismo. Contudo, até então apenas a concentração de cAMP foi capaz de apontar para uma forte correlação, onde observa-se que as células de levedura apresentam os níveis de cAMP três vezes maior que a forma de micélio. Em um recente estudo, Pereyra e colaboradores (2006) demonstraram que o aumento de cAMP através da ativação da proteína quinase A (PKA) em *M. rouxii*, conduz a uma sinalização celular que culmina com a desorganização do citoesqueleto de actina. A partir deste ponto o crescimento dos esporos é direcionado de forma isodiamétrica que é o tipo de crescimento que permite a diferenciação dos conídios em leveduras.

No presente estudo, a obtenção da forma de levedura em *M. polymorphosporus* foi obtida de forma muito simplificada, sem o requerimento de anaerobiose como muitos trabalhos haviam descrito como sendo um parâmetro essencial para obtenção dessa morfologia. Alguns aspectos importantes como tamanho, reprodução por brotamento multipolar, despigmentação das células e produção de gás (dados não-mostrados), estão de acordo com os relatos anteriores e sugerem a existência da forma de levedura nesta espécie de *Mucor*, como sendo um representante dimórfico deste gênero. A exigência apenas do crescimento em meio de cultivo contendo fonte complexa, nos

---

sugere a hipótese de que estas formas fúngicas possam crescer no ambiente rico em nutrientes complexos como são os tecidos humanos. Como durante o isolamento do fungo para o diagnóstico laboratorial o ambiente utilizado é aeróbio, talvez só estejam sendo isoladas as formas de micélio, o que talvez subestime a presença de leveduras em tecidos humanos.

A diversidade estrutural bem como a ampla distribuição dos ácidos siálicos na natureza demonstra o quanto estes compostos estão envolvidos nos mais diferentes processos fisiológicos e evolutivos. Inicialmente, a expressão de ácidos siálicos era creditada apenas aos animais deuterostômios e às bactérias implicadas em patologias para esses animais. Porém, surpreendentemente vários estudos vêm comprovando a existência destes açúcares em organismos como insetos e fungos. A clonagem molecular de muitas enzimas de bactérias e de vertebrados envolvidas na biossíntese destas moléculas vem demonstrando seqüências similares entre elas (Angata & Varki, 2002).

No presente trabalho, o método de HPTLC permitiu a visualização de bandas com o mesmo perfil cromatográfico do Neu5Ac, mediante a comparação com o  $R_f$  do respectivo padrão e coloração característica, fato este que foi observado em 8 das 11 amostras analisadas. Vale destacar que, dois dos três isolados negativos para ácidos siálicos (*M. ramosissimus* e *M. circinelloides*) mostraram-se positivos para ácido siálico em outras das amostras analisadas, apesar da avaliação sob as mesmas condições de análíticas. Observando o caso de *M. ramosissimus* (0070 e 3087) em que, seguramente as amostras foram obtidas de ambientes bem diferentes, podemos sugerir a influência do meio na expressão desta molécula. Já no caso de *M. circinelloides* (0063 e 0066),

por desconhecimento da origem mais detalhada dos isolados japoneses nada podemos sugerir.

Através da dosagem química de ácidos siálicos pelo método de Warren houve a confirmação das análises por HPTLC, além de demonstrar que estes resíduos são expressos em diferentes proporções, compondo uma faixa que variou de 0,006 a 0.2 µg/mg de peso seco de células, corroborando estudos anteriores realizados com os fungos *Sporothrix schenkii* (ALVIANO *et al.* 1982; ODA *et al.* 1983), *Fonsecaea pedrosoi* (SOUZA *et al.*, 1986; ALVIANO *et al.*, 2004b), *Paracoccidioides brasiliensis* (SOARES *et al.*, 1993), *Cryptococcus neoformans* (RODRIGUES *et al.* 1997, 2003a), *Candida albicans* (SOARES *et al.*, 2000) e *Aspergillus fumigatus* (WASYLNKA, SIMMER, & MOORE, 2001). Todas as 08 amostras de *Mucor* spp, positivas para ácidos siálicos, foram avaliadas por GC-MS, o que permitiu a caracterização do ácido *N*-acetilneuramínico, uma vez que foi observado tempo de retenção característico para as condições cromatográficas utilizadas (aproximadamente 55 minutos), além do mesmo perfil de fragmentação no espectrômetro, tanto de amostras quanto do padrão do ácido *N*-acetilneuramínico. Os fragmentos característicos foram: 173; 205; 356; 373; 458; 536 e 624 m/e (Alviano *et al.*, 1999; Soares *et al.*, 2000).

O isolado URM 1044 (*M. polymorphosporus*) foi selecionado para a realização dos experimentos de interação com lectinas, pelo fato de ser a única amostra que conhecidamente foi isolada de tecidos humanos e de ter sido a primeira na qual nós detectamos quimicamente a presença de ácido siálico. Além disso, experimentos de ativação do sistema complemento por este fungo também vêm sendo realizados pelo nosso grupo de pesquisa. Com isso, a identificação de estruturas de superfície pode

---

contribuir para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na ativação do sistema complemento realizada por *M. polymorphosporus*.

Os experimentos de interação com lectinas em *M. polymorphosporus* serviram para avaliar a acessibilidade dos açúcares na superfície celular de conídios e leveduras. Mediante a análise por citometria de fluxo, ficou demonstrado a existência de Neu5Ac, uma vez que houve marcação para lectina LPA. Além disso, ficou demonstrado que estes açúcares encontram-se ligados aos resíduos subterminais de galactose ou *N*-acetilgalactosamina, por ligações do tipo  $\alpha$ 2,6 (SNA) e  $\alpha$ 2,3 (MAA) tanto nas formas de conídio quanto nas de leveduras.

Os elevados índices de manose, mediante marcações de *M. polymorphosporus* com a lectinas ConA, para o extrato celular de micélio e para a superfície celular das leveduras, estão de acordo com os estudos químicos anteriormente publicados (BARTINICKI-GARCIA, 1968; DOW & RUBERY, 1976; DATEMA *et al.*, 1977; DARNALL & VILLA., 1983).

Os elevados índices de manose, mediante marcações de *M. polymorphosporus* com a lectinas ConA, para o extrato celular de micélio e para a superfície celular das leveduras, estão de acordo com os estudos químicos anteriormente publicados para outras espécies de *Mucor* (BARTINICKI-GARCIA, 1968; DOW & RUBERY, 1976; DATEMA *et al.*, 1977; DOW, DARNALL & VILLA., 1983).

Muitos estudos vêm sugerindo a contribuição dos ácidos siálicos com cargas negativas às superfícies celulares, mediando assim os eventos iniciais de interação célula-célula ou célula-molécula (SCHAUER *et al.*, 1995; KELM & SCHAUER, 1997; SCHAUER, 2004). Em fungos patogênicos estudos também vêm apontando a

---

relevância destes resíduos, através da utilização de substrato catiônico de poli-L-lisina (SOARES *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 1997; WASYLNKA, SIMMER, & MOORE, 2001). Em conídios e leveduras de *M. polymorphosporus*, foi demonstrada a importância destes açúcares no fenômeno de interação eletrostática. Considerando-se que já é conhecida a presença de outros açúcares ácidos (polímeros de ácidos glucurônicos) a diminuição efetiva da interação ao substrato após o tratamento com sialidase demonstra que este componente, apesar de minoritário, possui um papel preponderante para a contribuição com cargas negativas à superfície celular do fungo. Além disso, foi demonstrado através da técnica de Western Blotting que o micélio de *M. polymorphosporus* apresenta sialoglicoconjugados que podem se apresentar formando ligações do tipo  $\alpha 2,3$  e  $\alpha 2,6$  sialilgalactosil. A banda comum a marcação com as lectinas SNA, MAA e ConA (massa molecular aparente de 66,7 kDa) apresenta similaridade com um antígeno imunodominante descrito em *Rhizopus oryzae* (WYSONG & WALDORF, 1987), de 66 kDa, o que pode permitir a realização de experimentos posteriores de comparação dessa banda com a de *Rhizopus* com relação a reatividade com o soro de pacientes com zigomicose, possibilitando assim posterior caracterização deste antígeno.

Os ácidos siálicos são componentes endógenos das células humanas. Um exemplo clássico são as hemácias, que apresentam um período curto de sobrevivência no sangue circulante e apresentam o teor de ácido siálico como marcador da sua "idade". A medida em que estas células alcançam a sua maturidade (120 dias) parte dos ácidos siálicos de superfície são perdidos e com isso são expostos os resíduos de

---

galactose os quais podem ser reconhecidos ocasionando a captura das hemácias por macrófagos (SCHAUER, 2004).

Muitos dos estudos abordando a ocorrência de ácidos siálicos em fungos, nos quais foram utilizadas marcações com lectinas e controles de incubação prévia com sialidase relataram o aumento da reatividade para a lectina *Arachis hypogaea* (PNA), sugerindo assim que o ácido siálico seria uma molécula capaz de mascarar a presença dos resíduos de galactose (ALVIANO *et al.*, 1982, 2004; SOUZA *et al.*, 1985; SOARES *et al.*, 1993, 2000; RODRIGUES *et al.*, 1997). De forma semelhante, os resíduos de Neu5Ac na superfície de *M. polymorphosporus* podem estar mascarando os sítios de interação para as lectinas que reconhecem galactose, uma vez que a marcação com a lectina PNA aumentou significativamente após o tratamento com sialidase. De fato, os ensaios de fagocitose sugerem a dificuldade de internalização dos conídios por monócitos e neutrófilos humanos, porém nos conídios tratados com sialidase houve um maior índice de fagocitose, com este aumento chegando a alcançar cerca de 3 vezes. Outro fato interessante foi a maior interação dos conídios com os monócitos. Uma possível explicação que pode ser dada para este resultado seria a presença de uma quitinase expressa em macrófagos (TJOELKER *et al.*, 2000). Assim com a clivagem da quitina (componentes majoritários da parede celular de zigomicetos), ocorreria perturbação da estabilidade desta estrutura, além da possibilidade da exposição de outros ligantes para interação com os macrófagos que conduziriam uma fagocitose mais eficiente. Em adição a este estudo, foi demonstrado que no maior agente etiológico da zigomicose, *Rhizopus oryzae*, a interação com células endoteliais parece ocorrer através da interação de receptores específicos que culminam com a fagocitose dos conídios (IBRAHIM *et al.*, 2005).

---

Dos principais derivados encontrados na natureza, o Neu5Ac é o de maior ocorrência nos mais diversos organismos. De forma semelhante, ele é encontrado em humanos e o segundo maior derivado, Neu5Gc, apesar de ocorrer freqüentemente no reino animal, não é facilmente encontrado em tecidos sadios de humanos, sendo somente detectado em determinados tumores (MALYKH *et al.*, 2001a; SCHAUER, 2004). A expressão de Neu5Ac em *M. polymorphosporus*, tal como observado em humanos nos faz supor que esses microrganismos possam escapar dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro, assim como verificado para outros microrganismos (ALVIANO *et al.* 1999; ANGNATA & VARKI, 2002), uma vez que o organismo humano está adaptado a reconhecer moléculas de ácido siálico, particularmente na forma de Neu5Ac, como próprias. Dessa forma, os mecanismos de reconhecimento da imunidade inata, só por este aspecto já se encontram-se prejudicados para a defesa do hospedeiro.

O relato da presença de ácidos siálicos em fungos vem aumentando nos últimos anos, porém o conhecimento sobre compostos sialilados em células fúngicas ainda é muito preliminar (Alviano *et al.*, 2004). Apesar do importante avanço nas últimas duas décadas na caracterização de ácidos siálicos em espécies fúngicas, pouco progresso tem sido feito no que diz respeito a biossíntese desses açúcares ácidos, bem como na identificação das moléculas que abrigam estes resíduos (Rodrigues *et al.*, 2003). Hamilton e colaboradores (1992) foram os primeiros a sugerir a existência de ácidos siálicos em um exoantígeno celular de natureza glicoproteica de *Cryptococcus neoformans*. Este fato foi confirmado em um estudo recente, detectando inclusive atividade de sialiltransferase neste patógeno, indicando que a síntese de ácido siálico é efetuada pela própria maquinaria bioquímica do fungo (RODRIGUES *et al.*, 2003).

---

Algumas bactérias já apresentam identificadas a via para síntese *de novo* do ácido siálico, que difere da descrita em células eucarióticas. Outros microrganismos possuem esta via “truncada”, aproveitando os precursores sialilados do hospedeiro animal (VIMR & LICHTENSTEIGER, 2002; VIMR *et al.*, 2004). Considerando o fato de ter se utilizado um meio quimicamente definido para obtenção e purificação de ácido siálico em *Mucor* spp, pode-se destacar a ocorrência da síntese *de novo* desse açúcar ácido nos isolados estudados.

A primeira etapa de uma infecção fúngica é a introdução do agente no tecido hospedeiro. A partir daí as infecções podem se limitar à porta de entrada ou tornarem-se sistêmicas, disseminando-se por via hematogênica ou por uma rota contígua. A introdução dos agentes infectantes na corrente sanguínea requer dano tecidual. Entre os fatores que se acredita serem responsáveis por este dano, pode-se destacar as enzimas hidrolíticas (VAN BURIKI & MAGGE, 2001). A maioria dos fungos produzem um largo espectro de hidrolases extracelulares, incluindo as peptidases, que em fungos saprófitas são secretadas com a finalidade de obter nutrientes para absorção, ao passo que em fungos patogênicos podem ser adicionadas a sua propriedade inicial funções mais especializadas durante a infecção (HUBE, 2000). Em fungos que apresentam como sítio de infecção, o extrato córneo, como é o caso dos dermatófitos a presença destas enzimas é de extrema importância. Já as SAPs de *Candida* sp estão envolvidas nos processos de adesão e penetração nos tecidos profundos do hospedeiro, e também com a degradação de componentes do sistema imune. Em muitos outros fungos vêm sendo descrita e atribuída possível contribuição dessas peptidases para o processo infeccioso (HUBE, 2000; MIYOSHI & SHINODA, 2000; MONOD *et al.*, 2002; HU & LEGER, 2004; SCHALLER *et al.*, 2005).

---

O gênero *Mucor* é amplamente estudado pela produção de várias enzimas com potencial biotecnológico (ALVES *et al.*, 2002; ALVES *et al.*, 2005). Muitos destes estudos abordam a ocorrência das peptidases (WANG, 1967; BOTTARO CASTILLA *et al.*, 1982;; DiSANTO & LOGAN, 1989, 1992; KAMADA *et al.*, 1991;; Andrade *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2005; Machalinski *et al.*, 2006). Entretanto, nenhum destes estudos enfocam a possível relevância destas peptidases na patogênese da zigomicose. Em virtude do importante dano tecidual que é observado nas lesões geradas por esta doença, somando-se a carência de estudos abordando possíveis fatores de virulência no gênero *Mucor*, nosso grupo decidiu investigar a secreção de peptidases para o meio extracelular nas formas de micélio e levedura de *M. polymorphosporus*.

Primeiramente foi avaliado o perfil de atividade peptidásica em sobrenadante de cultivo de micélio (ScM) obtido de meio definido de Czapek-Dox. Através da incubação deste com BSA solúvel na presença de tampões em diferentes valores de pH. Com isso, foi observada uma predominância de atividade em pH ácido e neutro com um pico ótimo de atividade em pH 4,0, detecção esta feita por dosagem de atividade peptidásica, bem como confirmação do perfil de proteólise pela técnica de SDS-PAGE (dado não-mostrado). Confirmado o pH ótimo de atividade, foram efetuados ensaios de inibição neste pH com objetivo de caracterizar parcialmente esta(s) atividade(s). Os experimentos sugerem que a atividade de ScM em pH 4,0 seja referente predominantemente a(s) aspártico(s) peptidase(s), uma vez que a hidrólise do BSA, foi completamente inibida por pepstatina A, seguindo-se de inibições parciais por 1,10-fenantrolina, E-64, iodoacetamida e PMSF, que são inibidores de metalo, cisteína, cisteína e serina/cisteína peptidases, respectivamente. Esta segunda maior inibição sugere a presença em menor teor de uma metalo-peptidase ou uma peptidase ativada

---

por metal, mas um estudo mais detalhado desta inibição comparando-se com outros inibidores de metalo-peptidases, bem como ensaios avaliando a participação de cátions divalentes na atividade enzimática se fazem necessários para direcionar melhor a caracterização desta peptidase.

Como forma de avaliar a especificidade desta(s) peptidase(s) foram realizados ensaios da capacidade do ScM de *M. polymorposporus* de clivar diferentes substratos protéicos constituintes do organismo humano, tais como laminina (componente de matriz extracelular), soro albumina humana (componente do sistema imune), mucina (componente das mucosas). Em todos estes substratos foi observada atividade proteolítica demonstrando assim a possibilidade destas peptidases serem responsáveis pelo rompimento de membrana basal possibilitando a disseminação do fungo, o escape dos mecanismos de reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro humano, bem como a capacidade de digerir compostos sialilados.

As aspártico peptidases secretadas por fungos geralmente apresentam mecanismo de atividade semelhante à pepsina. Muitos dos fungos patogênicos contém genes responsáveis pela codificação das Saps, inclusive em espécies de *Rhizopus*, sendo já caracterizada a uma família composta por 4 Saps (FARLEY & SULLIVAN, 1998). *Aspergillus fumigatus* secreta uma aspártico peptidase denominada Pep1 (MONOD *et al.*, 2002). O papel das Saps como fator de virulência de *Candida albicans* vêm sendo extensivamente estudado. A atividade das Saps nos isolados fúngicos de indivíduos com patologias orais é demonstrada ser maior do que em indivíduos saudáveis. As diferentes isoformas das Saps apresentam papéis importantes que vêm sendo atribuídos ao ciclo de vida do fungo e conforme o processo infeccioso

---

(SCHALLER *et al.*, 2005). Entretanto em *Mucor* sp os estudos demonstram a ocorrência de um mecanismo do tipo renina (RAO *et al.*, 1998; ANDRADE *et al.*, 2002).

Quanto à avaliação do perfil de atividade em sobrenadante de cultivo em levedura de *M. polymorphosporus*, foram realizados os mesmos ensaios para o estudo das atividades em ScM e as análises de atividade peptidásica em diferentes valores de pH mostram dois picos ótimos de atividade peptidásica. O maior em pH 4,0 e com inibição total pela pepstatina A, assim como em ScM, além de um pico de atividade em pH 8,0. Curiosamente, esta atividade pode ser inibida por iodacetamida, mas não inibida por outro inibidor específico de cisteína-peptidases, o E-64. Considerando o fato que a iodoacetamida é um inibidor para outras enzimas que não as cisteína-peptidases, mas que assim como estas possuem o grupamento tiol na sua estrutura e de que essa atividade foi capaz de ser inibida por tosil-lisil-clometil cetona (TLCK) (dado não mostrado), um inibidor específico de serina-peptidases do tipo “tripsina-like”, esta atividade em pH 8,0 pode ser de uma serina-peptidase. Em *M. rouxii* foi descrita uma serina-peptidase citosólica com pH ótimo de atividade em torno de 7,0 e capaz de ser inibida por PMSF (KAMADA *et al.*, 1991). Entretanto estudos mais aprofundados de caracterização da atividade de ScL em pH 8,0 devem ser realizados para definir a classe desta(s) peptidases, além de avaliar da capacidade de clivagem de diferentes substratos também neste sobrenadante.

Por fim, este estudo representa o início da extensa investigação a ser feita sobre os possíveis componentes de *Mucor* sp que possam estar relacionados com a patogênese da zigomicose.

## 6 - CONCLUSÕES

- As amostras de *M. polymorphosporus*, *M. ramannianus*, *M. racemosus*, *M. hiemalis*, *M. mucedo*, *M. ramosissimus* (URM 3087) e *M. circinelloides* (URM 480 e LIKA 0066) expressam ácido siálico sob a forma de Neu5Ac após crescimento em meio quimicamente definido;
- Esta expressão foi variável, compondo uma faixa de 0,006 a 0.2 microgramas de ácido siálico para cada miligrama de peso seco de massa miceliana;
- Estes açúcares encontram-se ligados aos resíduos subterminais de galactose ou *N*-acetilgalactosamina, por ligações do tipo  $\alpha$ 2,6 (SNA) e  $\alpha$ 2,3 (MAA) tanto nas formas de conídio quanto nas de levedura;
- A forma miceliana de *M. polymorphosporus* apresenta sialoglicoconjugados com ligações do tipo  $\alpha$ 2,6 e  $\alpha$ 2,3sialilgalactosil, além da presença de manose nestes glicoconjugados;
- Os ácidos siálicos da superfície de conídios e leveduras de *M. polymorphosporus* contribuem para a interação eletrostática das referidas morfologias;
- A interação dos conídios de *M. polymorphosporus* com neutrófilos e monócitos humanos é influenciada pelos ácidos siálicos;
- O ScM de *M. polymorphosporus* apresenta atividade peptidásica estendendo-se numa faixa acídica à neutra, com pico ótimo de atividade em pH 4,0 que pode ser inibida totalmente por pepstatina A, seguindo-se de inibições parciais por 1,10-fenantrolina, iodoacetamida/E-64 e PMSF;

- A atividade do ScM de *M. polymorphosporus* em pH 4,0 é capaz de degradar os substratos protéicos BSA, HSA, laminina e mucina;
  
- O ScL de *M. polymorphosporus* possui uma ampla faixa de atividade peptidásica, com os melhores picos de atividade nos pHs 4,0 e 8,0, sendo que estas atividades puderam ser inibidas por pepstatina A no pH 4,0 e iodacetamida e TLCK no pH 8,0.

## **7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABDEL-HAFEZ, S.I.I. (1984). Composition of fungal flora of four cereal grains in Saudi Arabia. *Mycophatologia*. 85: 53-57.

ALLER, A.I., ESCALANTE, R., TORRES, M.A. & MAZUELOS, E. M. (1997). Mucormicose pulmonar em um paciente leucêmico. *Rev. Iberoam. Micol.* 14: 78.

ALVES, M.H., CAMPOS-TAKAKI, G.M., OKADA, K., PESSOA, I.H.F. & MILANEZ, A.I. (2005). Detection of extracellular protease in *Mucor* species. *Ver. Iberoam. Micol.* 22: 114-17.

ALVES, M.H., CAMPOS-TAKAKI, G.M., PORTO, A.L.F. & MILANEZ, A.I. (2002). Screening of *Mucor* spp. For the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Braz. J. Microbiol.* 33: 325-30.

ALVIANO, C.S., PEREIRA, M.E.A., De SOUZA, W., ODA, L.R. & TRAVASSOS, L.R. (1982). Sialic acids are surface components of *Sporothrix schenckii* yeast forms. *FEMS Microbiol. Letters*. 15: 223-227.

ALVIANO, C.S., TRAVASSOS, L.R. & SCHAUER, R. (1999). Sialic acids in fungi: a minireview. *Glyconj. J.* 16: 545-554.

ALVIANO, D.S., FRANZEN, A.J., TRAVASSOS, L.R., HOLANDINO, C., ROZENTAL, S., EJZEMBERG, R., ALVIANO, C.S. & RODRIGUES, M.L. (2004a). Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. *Infect. Immun.*, 72: 229-237.

ALVIANO, D.S., RODRIGUES, M.L., ALMEIDA, C.A., SANTOS, A.L., COUCEIRO, J.N.S.S., SOARES, R.M.A., TRAVASSOS, L.R. & ALVIANO, C.S. (2004b). Differential expression of sialylglycoconjugates and sialidase activity in distinct morphological stages of *Fonsecaea pedrosoi*. *Arch. Microbiol.* 181: 278-286.

ANDRADE, V.S., SARUBBO, L.A., FUKUSHIMA, K., MIYAJI, M., NISHIMURAK. TAKAKI, G. M. C. (2002). Production of extracellular proteases by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source / substrate. *Braz. J. Microbiol.* 33: 106-110.

ANGATA, T. & VARKI, A. (2002). Chemical diversity in the sialic acid and related  $\alpha$ - keto acids: an evolutionary perspective. *Chem. Rev.* 102: 439-469.

ANGLUSTER, J. & TRAVASSOS, L.R. (1972). Comparison of the surface structure of choline-less *Torulopsis pintolopesii* grown on defined media with choline or methionine. *Arch. Microbiol.* 83: 303-312.

- 
- AOKI, S., ITO-KUWA, S., NAKAMURA, K., KATO, J., NINOMIYA, K. & VIDOTTO, V. (1994). Extracellular proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, **128**: 143-150
- BARRET, A.J., RAWLINGS, N.D. & O'BRIEN, E.A. (2001). The MEROPS database as a protease information system. *J. Struct. Biol.*, **134**: 95-102.
- BARRETO-BERGTER, E., PINTO, M.R. & RODRIGUES, M.L. (2004). Structure and biological functions of fungal cerebrosides. *An. Acad. Bras. Cienc.*, **76**: 76-84.
- BARTINICK-GARCIA, S. & LIPPMAN, E. (1968). Fungal morphogenesis: Cell wall construction in *Mucor rouxii*. *Science*. **3890** (165): 302-304.
- BARTINICK-GARCIA, S. (1968a). Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **22**: 87-108.
- BARTINICK-GARCIA, S. (1968b). Control of dimorphism in *Mucor* by hexoses: Inhibition of hyphal morphogenesis. *J. Bacteriol.* **96** (5): 1586-1594.
- BEYNON, R.J. & BOND, J.S. (1989). Proteolytic enzymes a practical approach. *In: The Practical Approach Series*. IRL Press at Oxford University Press.
- BHADURI, S., KURRLE, E., VANEK, E. & SPANEL, R. (1983). Mucormycosis in the immunocompromised host. *Infection*. **11**(3): 170-172.
- BLUM, H., BEIER, H. & GROSS, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. **8**: 93-99.
- BOELAERT, J.R., LOCHT, M., VAN CUTSEM, J., KERRELS, V., CANTINIEAUX, B., VERDONCK, A., VAN LANDUYT, H.W. & SCHNEIDER, Y.-J. (1993). Mucormycosis during deferoxamine therapy is a siderophore-mediated infection. *Am. Soc. Clin. Inv.* **91**: 1979-1986.
- BOTTARO CASTILLA, H.R., WAEHNER, R.S., MEINARDI, C.A., ZALAZAR, C.A. & FRAILE, E.R. (1982). Production of concentrate of *Mucor bacilliformis* acid protease. *Rev Argent Microbiol.* **2**: 115-8.
- BOUCHARA, J.P., SANCHEZ, M., CHEVAILLER, A., MAROT-LEBLOND, A., LISSITZKY, J.C., TRONCHIN, G. & CHABASSE, D. (1997). Sialic acid-dependent recognition of laminin and fibrinogen by *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect. Immun.* **65**: 2717-2724.
- BOWMAN, S.M. & FREE, S.J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*. **28**(8): 799-808.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-256.

- BROUTA, F., DESCAMPS, F., FETT, T., LOSSON, B., GERDAY, C. & MIGNON, B. (2001). Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis*. *Med. Mycol.*, **39**: 69-275.
- BUROKER-KILGORE, M. & WANG, K. K. W. (1993). A Coomassie brilliant Blue G-250-based colorimetric assay for measuring activity of Calpain. *Anal. Biochem.* **208**: 387-392.
- CHAFFIN, W.L., LÓPEZ-RIBOT, J.L., CASANOVA, M., GOZALBO, D. & MARTÍNEZ, J.P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62** (1): 130-180.
- CHAYAKULKEEREE, M., GHANNOUM, M.A. & PERFECT, J.R. (2006). Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **25**: 215-229.
- COOPER, B.H. (1987). A case of pseudoparacoccidioidomycosis: Detection of the yeast phase of *Mucor circinelloides* in a clinical specimen. *Mycopathologia.* **97**: 189-193.
- COSTA, A.R., PORTO, E., TAYAH, M., VALENTE, N.Y.S, LUCAZ, C.S., MARANHÃO, W.M. & RODRIGUES, M.C. (1990). Subcutaneous mucormycosis caused by *Mucor hiemalis* Wehmer f. *leuteus*. (Linnemann) Schipper. *Mycoses.* **33**: 241-246.
- COSTA, E.M.M.B., SANTOS, A.L.S., CARDOSO, A.S., PORTELA, M.B., ABREU, C.M., ALVIANO, C.S., HAGLER, A.N. & SOARES, R.M.A. (2003). Heterogeneity of metallo and serine extracellular proteinases in oral clinical isolates of *Candida albicans* in HIV-positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **38**: 173-180.
- DANNAOUI, E., MELETIADIS, J., MOUTON, J.W., MEIS, J.F.G., VWEWEIL, P.E. & NETWORK, E. (2003). In vitro susceptibilities of zygomycetes to conventional and new antifungals. *J. Antimicrobial. Chem.* **51**: 45-52.
- DATEMA, R., WESSELS, J.G. & VAN DEN ENDE, H. (1977). The hyphal wall of *Mucor mucedo*: 2. Hexosamine-containing polymers. *Eur. J. Biochem.* **80** (2): 621-626.
- DAVIES, R.R. (1972). Protothecosis and opportunistic fungal infections. *Trans. St. John's Hosp. Dermatol. Soc.* **58**: 38-42.
- DELGADO, W. & AGUIRRE, J.M. (1997). Oral mycoses in the AIDS era. *Rev. Iberoam. Micol.* **14** (1): 14-22.
- DiSANTO, M.E. & LOGAN, D.A. (1989). Peptidase activities during morphogenesis of *Mucor racemosus*. *Arch. Microbiol.* **152**: 492-98.

- 
- DiSANTO, M.E., li, Q. & LOGAN, D.A. (1992). Purification and characterization of a developmentally regulated carboxipeptidase from *Mucor racemosus*. J. Bacteriol. **174** (2): 447-455.
- DOUVIN, D., LETICHOUX, Y. & HUGUET, C. (1975). Phycomyose gastrique diagnostic anatomo-pathologique et mycogique precoce evolution favorable sous traitement medical puis chirurgical. Arch. Anat. Pathol. **23**: 133-138.
- DOW, J.M, DARNALL, D.M. & VILLA, V.D. (1983). Two distinct classes of polyuronide from the cell walls of a dimorphic fungus, *Mucor rouxii*. J. Bacteriol. **155** (3): 1088-1093.
- DOW, J.M. & RUBERY, P.H. (1977). Chemical fractionation of the cell walls of mycelial and yeast-like forms of *Mucor rouxii*: A comparative study of the polysaccharide and glycoprotein components. J. Gen. Microbiol. **99**: 29-41.
- DRESCHLER, C. (1960). Two new species of *Conidiobolus* found in plant detritus. Am. J. Bot. **47**: 368-377.
- EL-ANI, A.S. & DHAR, V. (1981). Mucormycosis in case of metastatic carcinoma. Am. J. Clin. Pathol. **77**: 110-114.
- EL-TARABILY, K.A., SOLIMAN, M.H., NASSAR, A.H., AL-HASSANI, HA., SIVASITHAMPARAM, K., McKENNA, F. & HARDY, G.E.St.J. (2000). Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium actinomycetes. Plant. Pathol. **49**: 573-583.
- FARLEY, P.C. & SULLIVAN, P.A. (1998). The *Rhizopus oryzae* secreted aspartic-proteinase gene family: an analysis of gene expression. Microbiology. **144**: 2355-2366.
- FERGI, J.E., FITZWATER, D.S., EINSTEIN. & LEGGIARDO, R.J. (1992). *Mucor* peritonitis associated with acute peritoneal dialysis. Pediatr. Infect. Dis. J. **11**: 498-500.
- FIRON, A., LESAGE, G. & BUSSEY, H. (2004). Integrative studies put cell wall synthesis on the yeast functional map. Curr. Opin. Microbiol. **7**:617-623.
- FISHER, J., TUAZON, C.U., GEELHOED, G.W. (1980). Mucormycosis in transplant patients. Am. Surg. **46**: 315-322.
- FRESHNEY, R.I. (1994). In culture of animal cells: a manual of basic technique. New York. USA Inc., Publication. Wiley-Liss (ed).
- GEORGOPAPADAKOU, N.H. & TACKZ, J.S. (1995). The fungal cell wall as a drug target. Trends. Microbiol. **3**: 98-104.
- GOHEL, V., SINGH, A. VIMAL, M., ASHWINI, P. & CHHATPAR, H.S.(2006). Bioprospecting and antifungal of chitonolytic microorganisms, African. J. Biotechnol. **5**(2): 54-72.

- 
- GONZALEZ, C.E., RINALDI, M.G. & SUGAR, A.M. (2002). Zygomycosis. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **16**: 895-914.
- GÖRKÇİL, Z., ODABASI, Z., KUTUKCU, Y., UMUDUM, H., VURAL, O. & YARDIM, M. (1998). Rhino-orbito-cerebral mucormycosis. *J. Neurol.* **245**: 689-690.
- GOZALBO, D., ELORZA, M.V., SANJUAN, R., MARCILLA A., VALENTIN, E. & SENTANDREU, R. (1993). Critical steps in fungal cell wall synthesis: strategies for their inhibition. **60** (2): 337-345.
- HAMILTON, A.J., JEAUVONS, L., HOBBY, P. & HAY, R.J. (1992). A 24 to 38-kilodalton *Cryptococcus neoformans* glycoprotein produced as an exoantigen bearing a glycosylated species-specific epitope. *Infect. Immun.* **60**(1): 143-149.
- HAMILTON, A.J., JEVONS, L., YOUNGCHIM, S., VANITTANAKOM, N. & HAY, J. (1998). Sialic acid-dependent recognition of laminin by *Penicillium marneffe* conidia. *Infect. Immun.* **66**: 6024-6026.
- HARBARTH, S., BURKE, J.P., LLOYD, J.F., EVANS, R.S., PESTOTNIK, S.L. & SAMORE, M.H. (2002). Clinical and economic outcomes of conventional Amphotericin B-associated nephrotoxicity. *Clin. Infect. Dis.* **35**: 120-127.
- HENDRICKSON, R.G., OLSHAKER, J. & DUCKETT, O. (1999). Rhinocerebral mucormycosis: a case of rare, but deadly disease. *J. Emerg. Med.* **17**: 641-645.
- HERBRECHT, R., LETSCHER-BRU, V., BOWDEN, R.A., KUSNE, S., ANAISSIE, E.J., GRAYBILL, J.R., NOSKIN, G.A., OPPENHEIM, B.A., ANDRÈS, E. & PIETRELLI, L.A. (2001). Treatment of 21 cases of invasive mucormycosis with Amphotericin B colloidal dispersion. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**: 460-466.
- HOOPER, N.M. (2002). Proteases: a primer. *Essays in Biochem.*, **38**: 1-8.
- HU, G. & LEGER, J.St. (2004). A phylogenomic approach to reconstructing the diversification of serine proteases in fungi. *J. Evol.Biol.* **17**: 1204-1214.
- HUBE, B. (2000). Extracellular proteinases of human pathogenic fungi. *Contrib. Microbiol., Basel, Karger*, **5**: 126-137.
- HOGAN, L.H., KLEIN, B.S. & LEVITZ, S.M. (1996). Virulence factors of medically important fungi. *Clin.Microbiol.Rev.* **9**(4): 469-488.
- HUNG, C.Y., SESHAN, K.R. YU, J.J., SCHALLER, R., XUE, J., BASRUR, V., GARDNER, M.J. & COLE, G.T. (2005). A metalloproteinase of *Coccidioides posadasii* contributes to evasion of host detection. *Infect. Immun.* **73** (10): 6689-6703.

- 
- IBRAHIM, A.S., SPELLBERG, B., AVANESSIAN, V., FU, Y. & EDWARDS Jr, J.E. (2005). *Rhizopus orizae* adheres to, is phagocytosed by, and damages endothelial cells in vitro. *Infect. Immun.* **73** (2): 778-783.
- JORENS, P.G., BOELART, J.R., HALLOY, V., ZAMORA, R. SCHNEIDER, Y.J. & HERMAN, A.G. (1995). Human and rat macrophages mediate fungistatic activity against *Rhizopus* species differently: in vitro and ex vivo studies. *Infect. Immun.* **63**: 4489-4494
- KAMADA, T., BRACKER, C.E., LIPPMAN, E. & BARTINICKI-GARCIA, S. (1991). Unexpected destruction of chitosomal chitin synthetase by an endogenous protease during sucrose density gradient purification. *J. Cell. Sci.* **99**: 565-570.
- KELM, S. & SCHAUER, R. (1997). Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Intern. Rev. Cytol.* **175**: 137-240.
- KNEIPP, L.F., RODRIGUES, M.L., HOLANDINO, C., ESTEVES, F.F, SOUTO-PADRON, T., ALVIANO, C.S., TRAVASSOS, L.R. & MEYER-FERNANDES, J.R. (2004). Ectophosphatase activity in conidial forms of *Fonsecaea pedrosoi* is modulated by exogenous phosphate and influences fungal adhesion to mammalian cells. *Microbiology*, **150**: 3355-3362.
- KOGAN, T.V., MITTELMAN, L., HIRSCHBERG, K. & OSHEROV, N. (2004). Involvement of secreted *Aspergillus fumigatus* proteases in disruption of the actin fiber cytoskeleton and loss of focal adhesion sites in infected A549 lung pneumocytes. *J. Infect. Dis.*, **189**: 1965-1973.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- LATGÉ, J. P. & CALDERONE, R. (2002). Host-microbe interactions: Invasive human fungal opportunistic infections. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 355-358.
- LEHER, R.I., HOWARD, D.H., SYPHERD, P.S., EDWARDS, J.E., SEGAL, G.P. & WINGTON, D.J. (1980). Mucormycosis. *Ann. Intern. Med.* **93**: 93-108.
- LEHMANN, F., TIRALONGO, E. & TIRALONGO, J. (2006). Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function. *Cell. Mol. Life. Sci.* **63**: 1331-1354.
- LOWRY, O.H., ROZEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- MacDONALD, M.L., WEISS, P.J., DELOACH, L.J. & CORNER, S.W. (1994). Primary cutaneous mucormycosis with a *Mucor* species: is iron overload a factor? *Cutis.* **54**: 275-278.
- MARAVÍ-POMA, E., RODRÍGUES-TUDELA, J., JALÓN, J.G., MANRIQUE-LARRALDE, A., TORROBA, L., URTASUM, J., SALVADOR, B., MONTES, M., MELLADO, E., RODRÍGUEZ-ALBARRÁN, F. & PUEYO-ROYO, A. (2004). Outbreak of gastric

---

mucormycosis associated with the use of wooden tongue depressors in critically ill patients. *Intensive. Care. Méd.* **30**: 724-728.

MATTHEWS, R.C. & BURNIE, J.P. (2004). Recombinant antibodies: a natural partner in combinatorial antifungal therapy. *Vaccine*, **22**: 865-871.

MCDONALD, J.K. (1985). An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: Aspects related to nomenclature and classification. *Histochemistry*, **17**: 773-785.

MACHALINSKI, C., PIRPIGNANI, M.L., MARINO, C., MANTEGAZZA, A. & JIMÉNEZ BONINO, M.B. (2006). Structural aspects of the *Mucor* bacilliformis proteinase a new member of the aspartyl-proteinase family. **123**: 443-452.

MIYOSHI, S. & SHINODA, S. (2000). Metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect.*, **2**: 91-98.

MONOD, M. CAPOCCIA, S., LECHENNE, B. ZAUGG, C., HOLDOM, M. & JOUSSON, O. (2002). Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int. J. Med. Microbiol.*, **292**: 405-419.

NAGLICK, J.R., CHALLACOMBE, S.J. & HUBE, B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase in virulence and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Bio. Ver.*, **67** (3): 400-428.

NORTHROP, D.B. (2001). Follow the protons: a low-barrier hydrogen bond unifies the mechanisms of the aspartic protease. *Acc. Chem. Res.*, **34**: 790-797.

NOSANCHUK, J.D. & CASADEVALL, A. (2003). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cel. Microbiol.* **5**: 203-223.

NOSANCHUK, J.D., STEENBERGEN, J.N., SHI, L., DEEP Jr, G.S. & CASADEVALL, A. (2003). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cel. Microbiol.* **5**: 203-223.

ODA, L.M., KUBELKA, C.F., ALVIANO, C.S. & TRAVASSOS, L.R. (1983). Ingestion of yeast forms of *Sporothrix schenckii* by mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* **39**: 497-504.

ODDS, F.C., BROWN, J.P. & GOW, N.A.R. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *TRENDS. Microbiol.* **11** (6): 272-279.

OLIVER, M.R. VAN VOORTHIS, W.C., BOECKH, M. & BOWDEN, R.A. (1996). Hepatic mucormycosis in a bone marrow transplant recipient who ingested naturopathic medicine. *Clin. Infect. Dis.* **22**: 521-524.

ORLOWSKI, M., 1991. *Mucor* dimorphism. *Microbiol. Rev.* **55** (2): 234-258.

- 
- PALMEIRA, V.F., KNEIPP, L.F., ALVIANO, C.S. & SANTOS, A.L.S. (2006a). The major chromoblastomycosis fungal pathogen, *Fonsecaea pedrosoi*, extracellularly releases proteolytic enzymes whose expression is modulated by culture medium composition: implications on the fungal development and cleavage of key's host structures. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **46**: 21-9.
- PALMEIRA, V.F., KNEIPP, L.F., ALVIANO, C.S. & SANTOS, A.L.S. (2006b). Secretory aspartyl peptidase activity from mycelia of the human fungal pathogen *Fonsecaea pedrosoi*: Effect of HIV aspartyl proteolytic inhibitors. *Res. Microbiol.* **157**: 919-826.
- PANDIT, S.P. & RAHEEMA, M.A. (2003). Mucormycosis in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **121**(3): 382.
- PEREYRA, E. INGERFELD, M., ANDERSON, N. JACKSON, S.L. & MORENO, S. (2006). *Mucor rouxii* ultrastructure: cyclic AMP and actin cytoskeleton. *Protoplasma.* **228**: 189-199.
- PINTO, M.R., RODRIGUES, M.L., TRAVASSOS, L.R., HAIDO, R.M., WAIT, R. & BARRETO-BERGTER, E. (2002). Characterization of glucosylceramide in *Pseudallescheria boydii* and their involvement in fungal differentiation. *Glycobiology*, **12**: 251-260.
- PINTO, M.R., de SÁ, A.C., LIMONGI, C.L., ROZENTAL, S., SANTOS, A.L. & BARRETO-BERGTER, E. (2004). Involvement of peptidorhamnomannanin the interaction of *pseudoallescheria boydii* and Hep2 cells. *Microb. Infect.* **6**(14): 1259-1267.
- PLATAUF, A.P. (1885). Mycosis mucorina. *Virch. Arch.* **102**: 543-564.
- PREVOO, R.L.M.A., STARINK, T.M. & HAAN, P. (1991). Primary cutaneous mucormycosis in a healthy young girl. *J. Am. Acad. Dermatol.* **24**: 882-885.
- RAO, M.B., TANKSALE, A.M., GHATGE, M.S. & DESHPANDE, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* **62**(3): 597-635.
- RAWLINGS, N.D., TOLLE, D.P. & BARRET, A.J. (2004). Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.*, **378**: 705-716.
- REED, C.E. & HIROHITO, K. (2004). The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. *J. Allerg. Clin. Immun.* **114**: 997-1008.
- REICHARD, U. (1998). The significance of secretory and structure-associated proteases of *Aspergillus fumigatus* for the pathogenesis of invasive aspergillosis. *Mycoses*, **41**: (Suppl 1): 78-82.
- REICHARD, U., COLE, G.T., HILL, T.W., RUCHEL, R. & MONOD, M. (2000). Molecular characterization and influence on fungal development of ALP2, a novel serine proteinase from *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. Med. Microbiol.*, **290**: 549-558.

REUTER, G. & SCHAUER, R (1994). Determination of sialic acids. *Method Enzymol* **230**: 168-199.

RIBES, J.A., VANOVER-SAMS, C.L. & BAKER, D.J. (2000). Zygomycetes in human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 236-301.

RODRIGUES M.L., TRAVASSOS, L.R., MIRANDA, K.R., FRANZEN, A.J., ROZENTAL, S., DE SOUZA, W., ALVIANO, C.S. & BARRETO-BERGTER, E. (2000). Human antibodies against a purified glucosylceramide from *Cryptococcus neoformans* inhibit cell budding and fungal growth. *Infect. Immun.*, **68**: 7049-7060.

RODRIGUES, M.L., DOBROFF, A.S.S., COUCEIRO, J.N.S.S., ALVIANO, C.S., SCHAUER, R. & TRAVASSOS, L.R. (2003a). Sialylglycoconjugates and sialyltransferase activity in the fungus *Cryptococcus neoformans*. *Glyconj. J.* **19**: 165-173.

RODRIGUES, M.L., REIS, F.C.G., PUCCIA, R., TRAVASSOS, L.R. & ALVIANO, C.S. (2003b). Cleavage of human fibronectin and other basement membrane-associated protein by a *Cryptococcus neoformans* serine proteinase. *Microbiol Pathogen.*, **34**: 65-71.

RODRIGUES, M.L., ROZENTAL, S., COUCEIRO, J.N.S.S., ANGLUSTER, J., ALVIANO, C.S. & TRAVASSOS, L.R. (1997). Identification of N-acetylneuraminic acid and its 9-O-acetylated derivative on the cell surface of *Cryptococcus neoformans*: influence on fungal phagocytosis. *Infect. Immun.* **65**: 4937-4942.

ROONEY, P.J. & BRUCE, S.K. (2002). Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cel. Microbiol.* **4**(3): 127-137.

ROOSE J.P. & VAN NOORDEN C.J.F. (1995). Synthetic protease inhibitors: promising compounds to arrest pathologic processes. *J. Lab. Clin. Med.*, **125**: 433-441.

RUIZ-HERRERA, J., ELORZA, M.V., VALENTÍN, E. & SENTARDREU, R. (2006). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS. Yeast. Res.* **6**: 14-29.

SAN-BLAS, G. (1982). The cell wall of fungal human pathogens: Its possible role in host-parasite relationships (A review). *Mycopathologia (Den Haag)*. **79**: 159-184.

SANTOS, A.L.S, ABREU, C.M., ALVIANO, C.S. & SOARES, R.M.A. (2005). Use of proteolytic enzymes as an additional tool for trypanosomatid identification. *Parasitol.* **130**: 79-88.

SANTOS, A.L.S. & SOARES, R.M.A. (2005). *Candida guilliermondii* isolated from HIV-infected human secretes a 50 kDa serine proteinase that cleaves a broad spectrum of proteinaceous substrates. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **43**: 13-20.

- 
- SANTOS, A.L.S., FERREIRA, A., FRANCO, V.A., ALVIANO, C.S. & SOARES, R.M.A. (1999). Characterization of proteinases in *Herpetomonas angusteri* and *Herpetomonas roitmani*. *Curr. Microbiol.*, **39**: 61-64.
- SANTOS, A.L.S., RODRIGUES, M.L., ALVIANO, C.S., ANGLUSTER, J. & SOARES, R.M.A. (2002). *Herpetomonas samuelpessoai*: dimethylsulfoxide-induced differentiation is influenced by proteinase expression. *Curr. Microbiol.*, **46**: 11-17.
- SCHALLER, M., BORELLI, C., KORTING, H.C. & HUBE, B. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, **48**: 365-377.
- SCHAUER, R. (2004). Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology*. **107**: 49-64.
- SCHAUER, R., KELM, S., REUTER, G., ROGGENTIN, P. & SHAW, L. (1995). Biochemistry and role of sialic acids. **2**: 7-49. Plenum Press, New York, USA.
- SHARON, N. & LIS, H. (1980). Carbohydrates in cell recognition. *Scientific. American*. 74-81.
- SIDRIM, J.J.C. & MOREIRA, J.L.B. (1999). Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica, p 234. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, BR.
- SILVA, B.A., PINTO, M.R., SOARES, R.M.A., BARRETO-BERGTER, E & SANTOS, A.L.S., (2006a). *Pseudallescheria boydii* releases metalloproteinases capable to cleave several proteinaceous compounds. *Res. Microbiol.*, *in press*.
- SILVA, B.A., SANTOS, A.L.S., BARRETO-BERGTER, E. & PINTO, M.R., (2006b). Extracellular peptidase in the fungal pathogen *Pseudallescheria boydii*. *Curr. Microbiol.*, *in press*.
- SLIFKIN, M. & DOYLE, R.J. (1990). Lectins and their applications to clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**: 197-218.
- SOARES, R.M.A., ALVIANO, C.S., ANGLUSTER, J. & TRAVASSOS, L.R. (1993). Identification of sialic acids on the cell surface of hyphae and yeast forms of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS. Microbiol. Letters*. **108**: 31-34.
- SOARES, R.M.A., ANGLUSTER, J., DE SOUZA, W. & ALVIANO, C.S. (1995). Carbohydrate and lipid components of hyphae and conidia of human pathogen *Fonsecaea pedrosoi*. *Mycopathologia.*, **132**: 71-77.
- SOARES, R.M.A., SOARES, R.M.A., ALVIANO, D.S., ANGLUSTER, J., ALVIANO, C.S. & TRAVASSOS, L.R. (2000). Identification of sialic acids on the cell surface of *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1474**: 262-268.

- 
- SOUZA, E.T., SILVA-FILHO, F.C., DE SOUZA, W., ALVIANO, C.S., ANGLUSTER, J. & TRAVASSOS, L.R. (1986). Identification of sialic acids on the cell surface of hyphae and conidia of the human pathogen *Fonsecae pedrosoi*. J. Med. Vet. Mycol. **24**: 145-153.
- SWEET, S.P., COOKSON, S. & CHALLACOMBE, S.J. (1995). *Candida albicans* isolates from HIV-infected and AIDS patients exhibit enhanced adherence to epithelial cells. J. Med. Microbiol. **43**: 452-457.
- TJOELKER, L.W., GOSTING, L., FREY, S., HUNTER, CL., LE TRONG, H., STEINER, B., BRAMMER, H. & GRAY, P.W. (2000). Structural and functional definition of the human chitinase chitin-binding domain. J. Biol. Chem. **275** (1): 514-520.
- TOBÓN, A.M., ARANGO, M., FERNÁNDEZ, D. & RESTREPO, A. (2003). Mucormycosis (zygomycosis) in a heart-kidney transplant recipient: recovery after posaconazole therapy. Clin. Infect. Dis. **36**: 1488-1491.
- TRONCHIN, G., ESNAULT, K., SANCHEZ, M., LARCHER, G., MAROT-LEBLOND, A. & BOUCHARA, J.P. (2002). Purification and partial characterization of 32 kilodalton sialic acid-specific lectin from *Aspergillus fumigatus*. Infect. Immun. **70**(12): 6891-6895.
- VAN CUTSEM J., VAN GERVEN, F., FRANSEN, J. & JANSSEN, P.A. (1989). Treatment of experimental zygomycosis in guinea pigs with azoles and with Amphotericin B. Chemotherapy. **35**: 267-272.
- VAN-BURIK, J.A.H. & MAGEE, P.T. (2001). Aspects of fungal pathogenesis in humans. Annu. Rev. Microbiol., **55**: 743-772.
- VIMR, E.R., KALIVODA, K.A., DESZO, E.L. & STEENBERGEN, S.M. (2004). Diversity of microbial sialic acid metabolism. Microbiol. Molec. Biol. Rev. **68**: 132-153.
- VIRALLY, M.L., RIVELINE, J.P., VIRALLY, J., CHEVOJON, P., REGNARD, J.F., BELMEKKI, A. & DEVIDAS, A. (2002). Pulmonary mucormycosis in a diabetic patient with HIV. Diab. Care. **25**(11): 2105.
- WANG, H.W.A.L ( 1967). Release of proteinase from mycelium of *Mucor hiemalis*. J. Bacteriol. **93**: 1794-99.
- WARREN, L. (1959). The thiobarbituric acid assay of sialic acids. J.Biol. Chem. **234**(8): 1971-1975.
- WASYLNKA, J.A., SIMMER, M.I. & MOORE, M.M. (2001). Differences in sialic acid density in pathogenic and non-pathogenic *Aspergillus* species. Microbiology **147**: 869-877.
- WEIS, W.I., QUESENBERRY, M.S., TAYLOR, M.E., BEZOUSKA, K., HENDRICSON, W.A. & DRICKAMER, K. (1992). Molecular mechanisms of complex carbohydrate recognition at the cell surface. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. **LVII**: 281-289.

WEITZMAN, I., DELLA-LATTA, P., HOUSEY, G. & REBATTI, G. (1993). *Mucor ramosissimus* Samutsevich isolated from a thigh lesion. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2523-2525.

WOLF, D.H. (1992). Proteases as biological regulators. *Experientia*, **48**: 117-8.

ZABEL, D.D. (1997). Mycotic infection with mucormycosis. *Del. Med. J.* **69**: 459-463.

ZANETA, J-P., PONS, A., IWERSEN, M., MARILLER, C., LEROY, Y., TIMMERMAN, P. & SCHAUER, R. (2001). Diversity of sialic acids revealed using gas chromatography/mass spectrometry of heptafluorobutyrate derivatives. *Glycobiol.* **11** (8): 663-676.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)