

INTERAÇÕES INTER-MOLECULARES DA ENOLASE DE *Paracoccidioides brasiliensis*

Keila Patrícia Almeida de Carvalho^a, Célia Maria de Alemida Soares^{a,*}

^a*Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO
74001-970, Brasil*

E-mail: keilapatricia_carvalho@hotmail.com

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, interação patógeno-hospedeiro, enolase

1 INTRODUÇÃO

1.1 Paracoccidioidomicose

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (ALMEIDA, 1930), endêmica na América Latina, com alta incidência no Brasil (COUTINHO *et al.*, 2002). Apesar de estender-se do México à Argentina, não há homogeneidade na distribuição dos casos. No Brasil são encontrados 80% dos casos relatados e os outros dois países com maiores índices de casos são Colômbia e Venezuela. (BRUMMER, 1993; HAHN, 2002; UNTERKIRCHER, 2004).

Estima-se que mais de 10 milhões de indivíduos estejam infectados, com cerca de 2% desenvolvendo a doença (RESTREPO, MCEWEN & CASTAÑEDA, 2001). Nas áreas onde a PCM é altamente endêmica, a incidência da doença é estimada em aproximadamente 1 a 3 casos clínicos para cada 100.000 habitantes por ano (RESTREPO, 1985).

A PCM é uma doença granulomatosa, caracterizada histologicamente pela formação de tubérculos epiteliais com áreas centrais de necrose, agregados de leucócitos polimorfonucleares, um halo linfomononuclear e fibrose (BRITO & FRANCO, 1994). O progresso da patologia e a diversidade das formas clínicas dependem dos fatores imunológicos do hospedeiro (FRANCO, 1987) e dos diferentes níveis de virulência dos diversos tipos de isolados do fungo (SAN-BLAS & NIÑO-VEGA, 2001).

A PCM causa a morte, principalmente, de homens adultos, trabalhadores de área rural, em idade produtiva, de camada social de baixa renda e em pacientes com deficiência imunológica. Antes da puberdade, a

infecção ocorre com a mesma frequência nos sexos masculino e feminino. Após este período, a frequência da PCM passa a ser maior nos indivíduos do sexo masculino (MARTINEZ, 1997). Este fato tem sido explicado pela ação protetora dos hormônios estrógenos na mulher adulta (CLEMONS *et al.*, 1990) e pelo menor contato das mesmas com as fontes de infecção. O trabalho com o solo é fator ocupacional importante para predisposição à PCM (MARQUES *et al.*, 1983).

A via inalatória é a principal porta de entrada deste fungo no hospedeiro humano (PEDROSA, 1976). Ao serem inalados, os propágulos inicialmente atingem os pulmões e posteriormente se disseminam, tanto pela circulação sangüínea, quanto pelo sistema linfático para outros órgãos e sistemas (FRANCO, 1987, SAN BLASS *et al.* 2002). A pele e mucosas são também vias de inoculação do microrganismo através de implantação traumática (CASTRO *et al.*, 1975), e a transmissão inter-humana parece não ocorrer (BARBOSA & DAHER, 1991).

1.2 Matriz extracelular e adesinas

A aderência de patógenos às células do hospedeiro é considerada um passo essencial no estabelecimento da infecção (MARCHAIS *et al.*, 2005). Vários fungos de importância clínica como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis carinii*, *Sporothrix schenckii* e *Penicillium marneffeii* são conhecidos por se ligarem às proteínas da matriz extracelular (MEC) (GONZALEZ *et al.*, 2004). Uma colonização bem-sucedida geralmente é um evento complexo e deve envolver proteínas na superfície do fungo, componentes de matriz extracelular e receptores celulares do hospedeiro (SOHN *et al.*, 2006). As adesinas presentes no fungo, que interagem com receptores do hospedeiro, são de grande importância na modulação da migração, invasão, diferenciação e proliferação microbiana. Proteínas do hospedeiro como laminina, colágeno, fibronectina e fibrinogênio, têm sido propostas como ligantes celulares para os patógenos (PATTI *et al.*, 1994). Desse modo, foi sugerido que a adesão às células do hospedeiro e superfícies mucosas é um passo crucial no estabelecimento da infecção (HANNA *et al.*, 2000).

A MEC serve como substrato não somente para a adesão das células ao organismo, mas também para a adesão de microrganismos colonizadores. Muitos organismos expressam proteínas na superfície celular que podem mediar a sua adesão à MEC dos tecidos do hospedeiro (PATTI *et al*, 1994). As interações com o hospedeiro são mediadas por moléculas complementares em ambas, as superfícies do fungo e das células hospedeiras e tecidos. As moléculas fúngicas que atuam nessas interações foram designadas adesinas e o grande repertório de adesinas exibidas pelos fungos é um reflexo da variedade de sítios que eles podem invadir no hospedeiro (HOSTETTER, 1994; LÓPEZ-RIBOT *et al*, 1996). A expressão diferencial dos vários genes que codificam adesinas capacita os fungos a rapidamente adaptarem suas propriedades adesivas a um ambiente em particular (VERSTREPEN and KLIS, 2006).

González *et al* (2005), demonstraram que *P.brasiliensis* possui na sua superfície duas proteínas, uma de 19 kDa e outra de 32 kDa, que interagem com laminina, fibronectina e fibrinogênio. Outra proteína, a gp43, que é um componente antigênico do fungo usado em vários testes sorológicos, já havia sido identificada como um receptor de laminina (VICENTINI *et al*, 1994). Este grupo mostrou, por análises de Western blot com extrato livre de células de *P.brasiliensis*, que a laminina se liga especificamente a gp43.

Em *P.brasiliensis* outras adesinas já foram identificadas. Andreotti *et al* (2005), isolaram e caracterizaram uma proteína de 30 kDa que se ligou à laminina mas não à outros componentes da MEC. Proteínas que se ligam à laminina podem contribuir para a infecção por mediar a adesão e manutenção do fungo nos tecidos. A proteína gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que está associada à parede celular, foi identificada como uma adesina por sua capacidade de se ligar à fibronectina, laminina e colágeno tipo I (BARBOSA *et. al*, 2006, 2008), assim como a malato sintase, que também foi localizada na superfície celular e reconhecida como uma adesina por se ligar a fibronectina e colágenos tipo I e IV (SILVA NETO *et. al*, 2009).

1.3 Enolase

A enzima enolase (2-fosfo-D-glicerato hidrolase, EC 4.2.1.11) é uma metaloenzima que catalisa a desidratação de 2-fosfo-D-glicerato (PGA) a fosfoenolpiruvato (PEP) na segunda metade da via glicolítica. Na reação reversa, via anabólica, que ocorre durante a gliconeogênese, a mesma enzima catalisa a hidratação de PEP a PGA. A enolase é uma das enzimas citoplasmáticas mais abundantemente expressas em muitos organismos (PANCHOLI, 2001).

Em células de mamíferos, já foram identificadas três isoformas de enolase, α -(ENO1), β -(ENO3) e γ -(ENO2). ENO1 é vastamente distribuída em uma variedade de tecidos, enquanto ENO2 e ENO3 são encontradas exclusivamente nos tecido neuroendócrino e músculo, respectivamente (CHANG *et al*, 2006). Além de sua função glicolítica, ENO1 já foi encontrada na superfície de monócitos e neutrófilos atuando como um receptor de plasminogênio, implicando num possível papel na invasão tecidual (REDLITZ *et al*, 1995). A enolase já foi observada em várias doenças uma vez que anticorpos anti-enolase têm sido encontrados em condições autoimunes, incluindo a doença inflamatória de Bowel e o lúpus eritematoso discóide (YOUSEFI *et al*, 2000).

Análises subtrativas de cDNAs de *P.brasiliensis* foram realizadas, através da técnica de RDA (Análise Diferencial Representacional), durante a incubação de células leveduriformes com componentes da matriz extracelular, tais como laminina, fibronectina e colágeno. A partir dessas análises foi possível identificar-se uma proteína, altamente expressa, em todas as condições analisadas, a qual foi identificada como um homólogo de enolase em *P. brasiliensis*. Tais resultados indicam o papel desta proteína na adesão e conseqüentemente na virulência do patógeno *P. brasiliensis* (NOGUEIRA *et al*, 2010).

2 OBJETIVOS

Em função do exposto e do potencial papel da proteína na interação patógeno-hospedeiro, foram realizadas análises de interação da enolase com outras moléculas de *P. brasiliensis* através do sistema de pull-down.

3 MATERIAIS E MÉTODO

Foram realizadas análises de interação da enolase com outras proteínas de *P. brasiliensis* através do sistema de pull-down, que consistiu das seguintes etapas:

3.1) Ligação de moléculas da proteína recombinante (obtidas por meio de clonagem de cDNAs codificantes em vetor pGEX-4-T3 (GE Healthcare) em resina Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) e transformadas em bactéria *Escherichia coli* linhagem pLYS, com indutor IPTG) à resina Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare);

3.2) incubação do complexo recombinante-resina, durante 180 minutos, com extrato celular total de leveduras do fungo - para interação com proteínas dele;

3.3) separação das proteínas por eletroforese unidimensional;

3.4) remoção manual das proteínas do gel, tratamento com acetonitrila 100% e redução com DDT;

3.5) digestão enzimática das amostras com tampão de digestão contendo tripsina (12,5 ng/μL) (Roche, Molecular Biochemicals) e NH₄HCO₃ (25 mM);

3.6) análise dos peptídeos resultantes por espectros de massa e identificação por MALDIMS/MS utilizando o aparelho SYNAPT QTOF (Waters®);

3.7) busca em banco de dados utilizando o software ProteinLynx 2.3 (Waters®).

4 RESULTADOS

Procedeu-se à realização da técnica de pull-down como descrito acima. A figura 1 mostra o gel resultante da eletroforese unidimensional, com as proteínas de interesse marcadas em vermelho. Essas proteínas foram removidas do gel, tratadas e identificadas por espectrometria de massas e busca em banco de dados, mostrados na tabela 1.

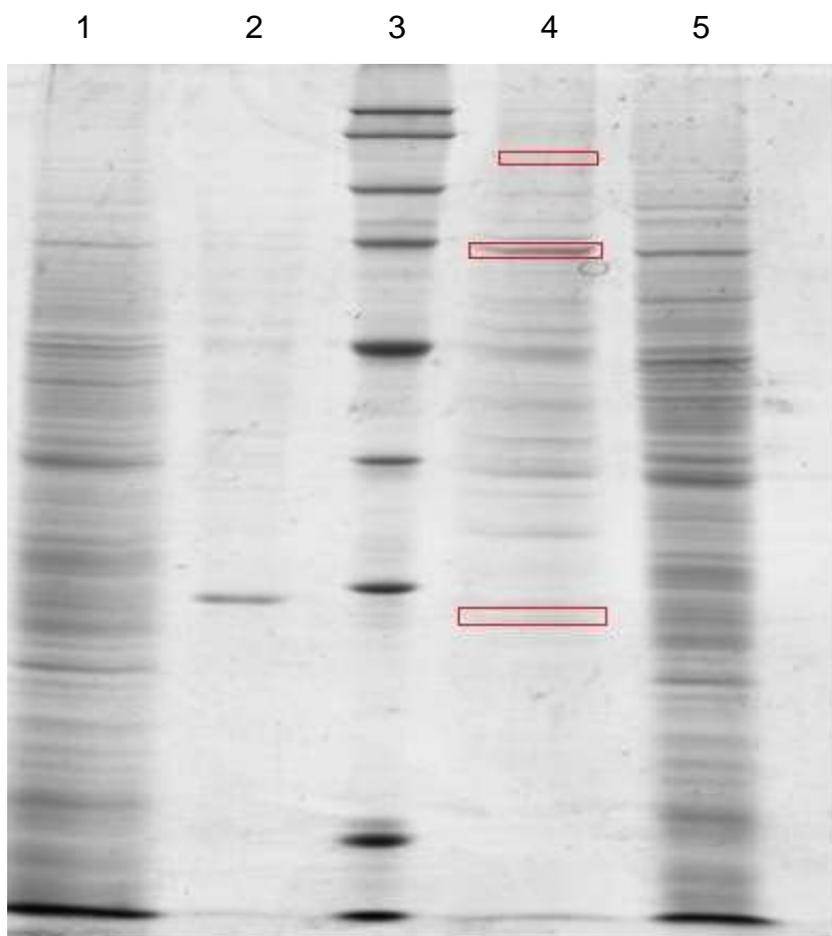


Figura 1: Pull-down da enolase de *P. brasiliensis*. Coluna 1: Sobrenadante de incubação (GST). Coluna 2: GST ligada à resina. Coluna 3: Marcador de massa molecular (Biosystems).

Coluna 4: enolase ligada à resina depois da incubação. Coluna 5: Sobrenadante de incubação (enolase).

Tabela 1: identificação por espectrometria de massas e busca em banco de dados das proteínas extraídas de gel unidimensional (figura 1).

Accession number	pI	PMF		MS/MS		Peptides sequence
		Score	Coverage (%)	Total score	Peptides score	
gi 146762537	5.67	141	63			
gi 295658218	6.36	255	67	71	17 29 25	K.RLFGVTTLDVVR.A K.AHNILGGITEQEK.K K.GIVEPTYIYLSGVDGGEAI KR.E
gi 295673194	6.12	169	50	49	16 12 22	R.DKEAYAINAR.S K.NAYRVETFR.S R.SASSLPDNHEQQLR.C

Tabela 1: identificação por espectrometria de massas e busca em banco de dados das proteínas extraídas de gel unidimensional (figura 1). Linha 1: dados referentes à enolase. Linha 2: dados referentes à malato desidrogenase. Linha 3: dados referentes à glutamato desidrogenase.

5 Discussão

Através da técnica de pull-down, algumas proteínas mostraram interação com a enolase. Interações proteína-proteína estáveis são mais fáceis de serem

identificadas por métodos físicos como o pull-down, que, por meio das interações *in vitro*, contribui para detecção das interações proteína-proteína de uma forma mais direta.

A enzima malato desidrogenase mostrou interação com a enolase nesse ensaio de pull-down. A malato desidrogenase é uma enzima do ciclo do ácido cítrico que catalisa a conversão de malato em oxaloacetato e vice-versa e também está envolvida na gliconeogênese, reduzindo o oxaloacetato em malato.

A enzima glutamato desidrogenase, que também mostrou interação com a enolase nesse ensaio, tem atividade no metabolismo de nitrogênio – ciclo da uréia -, catalisando a deaminação do glutamato a α -cetoglutarato e amônia.

A interação das enzimas malato desidrogenase e glutamato desidrogenase com enolase provavelmente ocorre a nível citoplasmático e está relacionada com processos metabólicos essenciais à sobrevivência do fungo, uma vez que ambas participam de vias metabólicas que envolvem a produção de metabólitos essenciais à sobrevivência do fungo.

6 Considerações finais

Moléculas de superfície de *P. brasiliensis* que se ligam a receptores celulares do hospedeiro durante a adesão e invasão podem ser interessantes alvos para o desenvolvimentos de vacinas e terapias anti-fúngicas. Sendo assim, a análise das interações da enolase com outras proteínas constitui uma importante estratégia no estudo do papel biológico desta proteína na patogênese de *P. brasiliensis*.

7 REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ANDREOTTI P.F., DA SILVA J.L.M., BAILÃO A.M., SOARES C.M.A., BERNARD G., SOARES C.P., MENDES-GIANNINI. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect.** v. 7, p. 875-81, 2005.

BARBOSA M.S., BÁO S.N., ANDREOTTI P.F., DE FARIA F.P., FELIPE M.S.S., FEITOSA L.S., MENDES-GIANNINI M.J.S., SOARES C.M.A. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. **Infec Immun.** v. 74, p. 382-9, 2006.

BARBOSA, M.S., A enzima gliceraldeído-3- fosfato dehidrogenase atua como uma adesina em *Paracoccidioides brasiliensis*, 2007. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) Resumo em **Rev. Biol. Neotrop.**, v. 5, p. 75-76. 2008

BARBOSA, W.; DAHER, R.R. Blastomicose Sul-Americana (Paracoccidioidomicose). In: Veronesi, R.; Focaccia, R.; Dietze, R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 8ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1991.

BERGMANN S., ROHDE M., CHHATWAL G.S., HAMMERSCHMIDT S. Characterization of plasmin(ogen) binding to *Streptococcus pneumonia*. **Indian J Med Res.** v. 119, p. 29-32, 2003.

BORGES C.L., Genes diferencialmente expressos em *Paracoccidioides brasiliensis*. 2008. **Tese (Doutorado em Patologia Molecular)** – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

BRITO, T.; FRANCO, M.F. Viewpoint. Granulomatous inflammation. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v. 36, p. 185-192, 1994.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, n. 2, p. 89-117, 1993.

BRUMMER, E.; HANSON, L.H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication of by activated macrophages. **Infect. Immun.** v. 57, p. 2289-2294, 1989.

CALICH, V.L.; VAZ, C.A.; BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Res. Immunol.**, v. 149, p. 407-417, 1998.

CARNEIRO C.R.W, POSTOL E., NOMIZO R., REIS L.F.L., BRENTANI R.R. Identification of enolase as a laminin-binding protein surface of *Staphylococcus aureus*. **Microbes Infect.** v. 6, p. 604-8, 2004.

CASTRO, R.M.; CUCÉ, L.E.; FAVA-NETO, C. Paracoccidioidomicose. Inoculação experimental in “anima nobile”. Relato de um caso. **Med. Cutan. Ibero Lat. Amer**, v. 3, p. 289-292, 1975.

CHANG G.C., LIU K.J., HSIEH C.L., HU T.S., CHAROENFUPRASERT S., LIU H.K., LUH K.T., WENWU C., TING C.C., CHEN C.Y., CHEN K.C., YANG T.Y., CHOU T.Y., HUAWANG W., WHANG-PENG J., SHIH N.Y. Identification of α -enolase as an autoantigen in lung cancer: its overexpression is associated with clinical outcomes. **Clin Cancer Res.** v. 12, p. 5746-54, 2006.

CHIEN C.T., BARTEL P.L., STERNGLANZ R., FIELDS S. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 88, n. 21, p. 9578–9582, 1991.

CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A. Interactions of mammalian steroid hormones with *Paracoccidioides brasiliensis*: estradiol receptor binding and mediation of cellular functions. **Interciencia,** v. 15, p. 206-208, 1990.

COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZÉRA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M.; SABROZA, P. C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad. Saúde Pública,** v. 18, n. 5, p. 1441-1454, 2002.

DIETZE, R.; FOWLER, V.G.Jr.; STEINER, T.S.; PECANHA, P.M. and COREY, G.R. Failure of amphotericin B colloidal dispersion in the treatment of paracoccidioidomycosis. **J. Trop. Med. Hyg.,** v. 6, p. 837-839, 1999.

DONOFRIO, F.C., CALIL, A.C.A., MIRANDA, E.T., ALMEIDA, A.M.F., BERNARD, G., SOARES, C.P., NOGUEIRA, S.V., SOARES, C.M.A., MENDES-GIANNINI, M.J.S. Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. **J. Med. Microbiol** v. 58, p. 706-713.2009.

FIELDS S., SONG O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. **Nature.** v. 340, n. 6230, p. 245–246, 1989.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.,** v. 25, p. 5-18, 1987.

GEORGOPAPADAKOU, N.H. and WALSH, T.J.. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. **Antimicrobiol. Age. Chem.,** v.40, p. 279-291, 1996.

GONZÁLEZ A., GÓMEZ B.L., DIEZ S., HERNÁNDEZ O., RESTREPO A., HAMILTON A.J., CANO L.E. Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. **Infect Immun.** v. 73, p. 2486-95, 2005.

HANH, R. C.; MACEDO, A. M.; SANTOS, N. L.; RESENDE, J.C.P.; HAMDAN, J. S. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* atypical isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. **Rev. Iber. Micol.,** v. 19, p. 49-51, 2002.

HANNA S.A., DA SILVA J.L.M., MENDES-GIANNINI M.J.S. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. **Microbes Infect.** v. 2, p.877-884, 2000.

HOSTETTER M.K. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida albicans* spp. with epithelial and endothelial surfaces. **Clin Microbiol Rev.** v. 7, p. 29-42. 1994.

KNAUST A., WEBER M.V.R, HAMMERSCHMIDT S., BERGMANN S., FROSCHE M., KURZAI O. Cytosolic proteins contribute to surface plasminogen recruitment of *Neisseria meningitidis*. **J Bacteriol.** v.189, p. 3246-3255, 2007.

KONTOYIANNIS, D.P. and LEWIS, R.E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **Lancet.**, v.359, p. 1135-1144, 2002.

LÓPEZ-VILLAR E., MONTEOLIVA L., LARSEN M.R., SACHON E., SHABAZ M., PARDO M., PLA J., GIL C., ROEPSTORFF P., NOMBELA C. Genetic and proteomic evidences support the localization of yeast enolase in the cell surface. **Proteomics.** v. 6, p. 107-18, 2006.

LÓPEZ-RIBOT J.L., MONTEAGUDO C., SEPÚLVDA P., CASANOVA M., MARTÍNEZ J.P., CHAFFIN W.L. Expression of fibrinogen binding mannoprotein and the laminin receptor of *Candida albicans* *in vitro* and in infected tissues. **FEMS Microbiol Lett.** v. 142, p. 117-22, 1996.

MARCHAIS, V.; KEMPF, M.; LICZNAR, P.; LEFRANÇOIS, C.; BOUCHARA, J. P., ROBERT, R.; COTTIN, J.; DNA array analysis of *Candida albicans* gene expression in response to adherence to polystyrene. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.245, p. 25-32, 2005.

MARCILLA A., PÉREZ-GARCÍA A.P., ESPERT A., BERNAL D., MUNÓZ-ANTOLÍ C., ESTEBAN J.G., TOLEDO R. *Echinostoma caproni*: Identification of enolase in excretory/secretory products, molecular cloning, and functional expression. **Exp Parasitol.** v. 117, p. 57-64, 2007.

MARQUES, S.A.; FRANCO, M.F.; MENDES, R.P.; SILVA, N.C.A.; BACCILI, C.; CURCELLE, E.D.; FERACI, A.C.M.; OLIVEIRA, C.S.; TAGLIARINI, J.V.; DILLON, N.L. Aspectos epidemiológicos da paracoccidiodomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo-Brasil). **Ver. Inst. Med. Trop.**, v. 25, p. 87-92, 1983.

MARTÍNEZ J.P., GIL M.L., LÓPEZ-RIBOT, J., CHAFFIN W.L. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. **Clin Microbiol Rev.** v. 11, p. 121-41, 1998.

MARTINEZ, R. Blastomicose-Sul-Americana (Paracoccidiodomicose)-Etiologia e Ecologia. In: Veronesi, R.; Focaccia, R. **Tratado de Infectologia.** 2. ed. Rio de Janeiro: Ateneu, p. 1082, 1997.

NOGUEIRA, S.V. Paracoccidiodomicose brasiliensis enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. **Infect. Immun.**, v. 78, n .9, p. 4040-4050, 2010

PANCHOLI V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. **Cell Mol Life Sci.** v. 58, p. 902-20, 2001.

PATTI, J. M.; ALLEN, B. L.; McGAVIN, M. J.; HOOK, M.. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 48, p.585-617, 1994.

PEDROSA, P.N. Paracoccidioidomicose, inquérito intradérmico com paracoccidioidina em zona rural do estado do Rio de Janeiro. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1976.

REDLITZ A., FOWLER B.J., PLOW E.F., MILES L.A. The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells. **Eur J Biochem.** v. 227, p. 407-15, 1995.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 23, p. 323-334, 1985.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med. Mycol. Rev.**, v. 39, p. 233-241, 2001.

SAN-BLAS, G., G. NIÑO-VEGA & T. ITURRIAGA. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol.**, v.40, n. 3, p. 225-242, 2002.

SEVERIN A., NICKBARG E., WOOTERS J., QUAZI S.A., MATSUDA Y.V., MRPHY E., MOUTSATSOS I.K., ZAGURSKY R.J., OLMSTED. Proteomic analysis and identification of *Streptococcus pyogenes* surface proteins. **J Bacteriol.** v. 189, p. 1514-22, 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; QUEIROZ-TELLES, F.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. Consenso em paracoccidioidomicose. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.39, p. 297-310, 2006.

SILVA NETO, B.R., SILVA, J.F., MENDES-GIANNINI, M.J.S., LENZI, H.L., SOARES, C.M.A., PEREIRA, M. The Malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorage adhesin. **BMC Microbiol.** v. 9, p. 272. 2009.

SOHN K., SENYÜREK I., FERTEY J., KÖNIGSDORFER A., JOFFROY C., HAUSER N., ZELT G., BRUNNER H., RUPP F. An *in vitro* assay to study the transcriptional response during adherence of *Candida albicans* to different human epithelia. **FEMS Yeast Res.** v. 6, p. 1085-93, 2006.

VERSTREPEN K.J., KLIS F.M. Flocculation, Adhesion and Biofilm Formation in Yeasts. **Mol Microbiol.** v. 60, p. 5-15, 2006.

VICENTINI A.P., GESZTESI J.L., FRANCO M.F., SOUZA W., MORAES J.Z., TRAVASSOS L.R., LOPES J.D. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect Immun.** v. 62, p. 1465-9, 1994.

YOUSEFI S., COOPER P.R., MUECK B., POTTER S.L., JARAI G.. cDNA representational difference analysis of human neutrophils stimulated by GM-CSF. **Biochem Biophys Res Commun.** v.277, p. 401-9, 2000.