



Universidade de Brasília
Pós Graduação em Patologia Molecular
Faculdade de Medicina

“Análise do transcriptoma parcial do fungo
Paracoccidioides brasiliensis recuperado após
infecção de macrófagos peritoneais murinos”.

Luciano Procópio da Silva

Orientadora: Prof. Dra. Ildinete Silva Pereira

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de Brasília como requisito parcial
à obtenção do grau de mestre em Patologia
Molecular (Bioquímica Molecular de
Microrganismos)

Brasília, 2006

Trabalho desenvolvido no Laboratório de
Biologia Molecular da Universidade de
Brasília, sob orientação da Prof. Dra.
Ildinete Silva Pereira.

Banca Examinadora:

Examinador Externo:

Dra. Natália Florêncio Martins

Laboratório de Bioinformática/Núcleo de Biotecnologia

EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia

Examinador Interno:

Dr. Marcio José Poças Fonseca

Departamento de Biologia Celular – IB/CEL

Universidade de Brasília (UnB)

Orientador:

Dra. Ildinete Silva Pereira

Departamento de Biologia Celular – IB/CEL

Universidade de Brasília (UnB)

Suplente:

Dra. Cynthia Maria Kyaw

Departamento de Biologia Celular – IB/CEL

Universidade de Brasília (UnB)

Dedico esse trabalho a todas aquelas pessoas que,
como eu, “vivem no mundo da lua”.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a **Deus** por toda luz em meu caminho.

À minha fantástica orientadora **Ildinete**, pela confiança, dedicação e principalmente pela paciência comigo!

Aos professores **Marcelo, Andréa e Cynthia**, que acompanharam de perto meu trabalho e muito contribuíram para sua realização e também na minha formação.

À professora **Sueli**, por acreditar em mim, pelos ensinamentos, apoio e principalmente, por ter-me notado entre tantos. Muito obrigado pelo apoio neste momento, ajudando a definir minha vida acadêmica e profissional.

A **todos os professores do laboratório de biologia molecular: Márcio, Marco Antônio** (valeram as aulas de ilustração, como já disse, posso não ser um bom ilustrador, mas serei ilustrador pelo resto de minha vida), **Élida, Fernando** (obrigado pela ajuda com o pessoal da PETRÓBRAS) e **Lídia**.

Aos **professores da banca**, pelo aceite em compor minha banca.

À minha eterna professora e tia **Aloísia** pelo apoio constante e presença em minha vida como tia, amiga e colega de profissão, e **total dedicação** em ajudar em minha jornada desde o primeiro momento de minha escolha pela Biologia.

À outra eterna professora, e tia-madrinha, **Antônia José**, a primeira a mostrar o universo da Biologia quando me levava para as aulas de campo de biologia quando eu ainda era criança! Obrigado pelos conselhos, pelas longas conversas e principalmente por estar sempre chamando minha atenção, querendo que eu coloque os pés no chão... (isso **nunca** vou conseguir fazer, aqui em cima é melhor), e por estar sempre acreditando em mim.

A vocês duas minha eterna gratidão, nunca poderei recompensar!

À professora **Maria Alice** pela torcida e consideração. Realmente é incrível como certas pessoas mudam nossa vida. Lembra no momento de minha desesperança! Quando a senhora entrou na sala e com um telefonema mostrou um caminho novo e maravilhoso? A senhora foi peça fundamental em minha vinda a BSB, e em minha vida!

Às meninas “super poderosas” da Biomol, **Lelê, PatyLu, Lizi, Rose e Chris**. **Lelê**, sinto falta de nossas brigas, obrigado por tudo, ensinamentos e paciência com minha eterna distração. **PatyLu**, pelos conselhos e pelas sempre prazerosas conversas. **Lizi**, volto logo a caminhar no parque tá? **Chrisinha**, muuuiito obrigado por estar sempre pronta em ajudar-me, arrumando lugar para eu ficar hospedado e depois morar, pela paciência nos pedidos de ajuda com matrículas e tudo mais, pelo apoio total no momento mais difícil que passei em BSB. Ah, e a sua maravilhosa mãe, **D. Nizinha**, por ter aberto sua casa e pelo apoio e confiança, a senhora foi uma mãe para mim. Saudades...

À **Carmela**, valeu por ter confiado em mim e ter aberto as portas de sua casa, serei eternamente grato!

Aos meus grandes amigos e colegas de Lab: **Lorena**, trabalhar com você é um barato, **Thiago**, amigão mesmo, valeu por tudo (se eu falar do “tudo” vou longe) e **Sérgio**, valeu as longas conversas e conselhos. **Popó Jr.** e **Marciano**, amigos, companheiros de lab e de moradia. Aos amigos **Rafa e Camila**, para de escrever **Rafa** e vamos beber!!!!

Aos amigos **Luanne e Cristian** (agregado), que façamos ainda muitas viagens e jantares juntos!

Alex e Mariana, que as farras continuem sempre! Aos amigos **Vivis, Túlio e Dantas**, pelos programas culturais. A **Saulo**, valeu por estar sempre presente, me ajudando e ouvindo meus desabafos. A **Mauro**, grande amigo! A **Gabi**, linda!!!

A toda galera dos **LabO, Lab1 e Lab2, Lab3 e Lab4**.

Ao **Aldo**, pelas orientações, conselhos e total apoio em meu projeto.

Aos amigos **André Nicola e PatyGirl**, obrigado pelas longas conversas, pelos maravilhosos jantares e pelos conselhos.

À professora **Maria Emília**, à **Maria José** e **Daniel**, valeram as dicas de bioinformática!

Aos grandes amigos e futuros sócios de negócio – olha o nosso restaurante, e futuros compadres: **Pedro e Cecília**, muito obrigado por serem meus amigões, amo vocês! E lembrem-se: se tudo der errado vamos para o Hawaii!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

À D. Ivanildes e Fátima, valeu as conversas na copa, e obrigado por ficarem agüentando minhas eternas reclamações.

Agradeço à Ella Fitzgerald, por ter feito as canções que me acompanharam por todo o meu trabalho. Jazz é o que há!

E finalmente, **as pessoas mais importantes de minha vida:**

Minha **mãe**, valeu pelo esforço, por ter dedicado **todos os segundos de sua vida** por mim e meu irmão. Por sempre confiar, acreditar e rezar por mim. Eu te admiro e a amo muito. Ah, obrigado também pelas discussões literárias.

Ao melhor amigo que alguém poderia ter, **meu irmão**, obrigado pelo eterno apoio. Meu maior orgulho é ser seu irmão, a pessoa mais cativante que conheci, valeu também a paciência pelos meus momentos de mau humor, e principalmente por ter-me presenteado com a melhor coisa que aconteceu em toda minha vida: **Lucas**, meu afilhado, sempre me esperando e não entendendo como fico tanto tempo na escola. Lucas, o padrinho está voltando logo, tá? Eu te amo de todo o meu coração!!!

Agradeço ao apoio financeiro disponibilizado pelo CNPq e ao projeto Pronex.

ÍNDICE

Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xii
Índice de Siglas e Abreviaturas	xiii
Resumo	xv
Abstract	xvii
1- INTRODUÇÃO	1
1.1 O fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e a paracoccidioidomicose	1
1.2 A interação patógeno-hospedeiro	8
1.3 O projeto transcriptoma de <i>P. brasiliensis</i>	13
1.3.1. As principais ferramentas do <i>pipeline</i> de análise empregado no projeto transcriptoma de <i>P. brasiliensis</i>	14
1.3.2. Visão geral do projeto transcriptoma de <i>P. brasiliensis</i>	17
1.3.3 Expressão de genes do genoma mitocondrial	18
1.3.4 O gene isocitrato liase de <i>P. brasiliensis</i>	20
2 - OBJETIVOS	23
2.1 Estratégia Experimental 1	23
2.2 Estratégia Experimental 2	23
3 - MATERIAL	24
3.1 Meios de Cultura - <i>Escherichia coli</i>	24
3.2 Meios de Cultura – <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	25
3.3 Antibióticos e soluções utilizadas para seleção de transformantes	26
3.4 Linhagens bacterianas	26
3.5 Plasmídios utilizados	26
3.6 Enzimas de restrição	27
3.7 Outras enzimas	27
3.8 Tampões de enzimas	27
3.9 Soluções de uso generalizado	27
3.10 Soluções utilizadas nos protocolos de transformação	28

3.11 Soluções para preparação de DNA plasmidial	29
3.12 Soluções para eletroforese em géis de agarose	29
3.13 Soluções para <i>Southern blot</i>	30
3.14 Marcadores de massa molecular (MM)	31
3.15 Oligonucleotídeos dos vetores	31
3.16 Oligonucleotídeos específicos	31
3.17 Kits utilizados	32
4 – MÉTODOS.....	33
4.1. Extração de RNA total de <i>P. brasiliensis</i> após infecção de macrófagos	33
4.2. Construção da biblioteca de cDNAs de <i>P. brasiliensis</i> após infecção de macrófagos	34
4.3 Semeadura e seqüenciamento de clones de cDNA da biblioteca PbY-MΦ	37
4.3.1. Minipreparação do DNA plasmidial a partir da biblioteca PbY-MΦ	37
4.3.2. Amplificação e seqüenciamento dos clones de cDNA	38
4.4 Análise computacional das ESTs	39
4.5 Caracterização dos genes <i>Pbicl1</i> e <i>Pbicl2</i>	39
4.5.1 Análise do número de cópias dos genes por <i>Southern blot</i>	39
4.5.2 Seqüência dos genes <i>Icl1</i> e <i>Icl2</i>	39
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Construção de uma biblioteca de cDNA de <i>P. brasiliensis</i> após infecção de macrófagos	41
5.2 Geração e análise computacional de ESTs	42
5.3 Agrupamento das ESTs	44
5.4 Análise de similaridades das seqüências geradas (<i>contigs</i> e <i>singlets</i>) em bancos de dados	45
5.5 Análise das seqüências relacionadas ao gene <i>icl</i> de <i>P. brasiliensis</i>	62
6- PRINCIPAIS RESULTADOS E CONCLUSÕES	71
7 - PERSPECTIVAS	73
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema dos principais passos do pipeline empregado para a geração e análise de ESTs do projeto “Genoma Funcional e Diferencial do Fungo *P. brasiliensis*”.

Figura 2. Esquema do ciclo do glioxalato (ciclo menor), regulado pelas enzimas isocitrato liase e malato sintase, e sua relação com o ciclo do ácido cítrico (ciclo maior).

Figura 3. Estratégia experimental de obtenção de RNA total, utilizado na construção da biblioteca de cDNA da forma levedura de *P. brasiliensis*, recuperado de macrófagos peritoneais de camundongos após 6 horas de infecção.

Figura 4: Esquema das principais etapas envolvidas na construção da biblioteca de cDNA PbY-MΦ (Adaptado de *SMART™ cDNA Library Construction Kit User Manual*).

Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, na concentração final de 0,5 µg/mL, ilustrando o perfil característico de DNAs plasmidiais preparados a partir de clones isolados e selecionados aleatoriamente da biblioteca de cDNA PbY-MΦ.

Figura 6: Estratégia de geração e agrupamento de ESTs.

Figura 7: Esquema do agrupamento das 474 seqüências da biblioteca PbY-MΦ e análise de similaridade com o banco de dados referente ao transcriptoma de *P. brasiliensis* na forma de micélio e levedura (PbAEST) cultivadas *in vitro* (Felipe *et al.*, 2003 e 2005).

Figura 8: Distribuição do número de seqüências de cada *contig* e o número de seqüências que permaneceram como *singlets*, após a análise pelo programa CAP3.

Figura 9: Esquema da cadeia respiratória responsável pela geração de gradientes de prótons no espaço intermembranoso da mitocôndria, representado pelos complexos I a IV.

Figura 10: Alinhamento entre as seqüências deduzidas de aminoácidos das *contig3*, *contig15* de PbY-MΦ e Cox1p de *Penicillium marneffe* (AC AAQ54924), usando o programa CAP3 disponível no BioEdit.

Figura 11: Mapa físico do genoma mitocondrial de *P. marneffe* mostrando o posicionamento das *contigs* e *singlets* do transcriptoma PbY-MΦ, que apresentaram similaridade com regiões do gene *cox1* desse fungo (Adaptado de Woo *et al.*, 2000).

Figura 12: Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos deduzida a partir da *contig12* da biblioteca PbY-MΦ e a seqüência Nad6p de *Epidermophyton floccosum* (AC AAW78247), usando a ferramenta CLUSTALW disponível no endereço <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>.

Figura 13: Esquema do provável posicionamento das *contigs* 1, 2 e 3 (retângulos verdes) e dos oligonucleotídeos internos (setas) em relação à seqüência do gene de *icl* de *Coccidioides immitis* (retângulo azul).

Figura 14: Alinhamento entre as seqüências deduzidas de aminoácidos das *contigs* 1, 2 e 3 de *P. brasiliensis* e ICL de *C. immitis* (AC AAK72548), usando o programa BioEdit.

Figura 15: Alinhamento entre as seqüências deduzidas de aminoácidos das *contig4* de *P. brasiliensis* e MCL de *Emericella nidulans* (AC CAI65406), usando a ferramenta CLUSTALW.

Figura 16: Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos das proteínas ICL de *C. immitis* (AC AAK72548), MCL de *E. nidulans* (AC CAI65406) e a seqüência deduzida de aminoácidos da *contig4* de *P. brasiliensis* usando o programa CLUSTALW.

Figura 17: *Southern blot* genômico de *P. brasiliensis*.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Principais características clínicas, imunológicas e histopatológicas das formas aguda, sub-aguda e crônica da paracoccidioidomicose.

Tabela 2. Linhagens bacterianas utilizadas.

Tabela 3. Enzimas de restrição utilizadas.

Tabela 4. Oligonucleotídeos específicos e sua utilização.

Tabela 5: Resultado das análises de similaridade, utilizando a ferramenta Blastn, dos principais grupos de seqüências da biblioteca PbY-M Φ (geradas neste trabalho), comparadas às PbAESTs do transcriptoma das formas de M e Y de *P. brasiliensis* cultivadas *in vitro* (Felipe *et al.*, 2003 e 2005).

Tabela 6: Seqüências do transcriptoma PbY-M Φ que não apresentaram similaridade com PbAESTs do transcriptoma das formas de M e Y de *P. brasiliensis* cultivado *in vitro* (Felipe *et al.*, 2003 e 2005): as seqüências de *P. brasiliensis* que potencialmente correspondem a novos genes ainda não descritos para esse fungo.

Tabela 7. PbAESTs relacionadas ao gene isocitrato liase (*icl*) obtidas pelo projeto transcriptoma das formas de M e Y de *P. brasiliensis* cultivado *in vitro* (Felipe *et al.*, 2003 e 2005), após análise pelo programa CAP3.

Tabela 8: Resultado das análises de similaridade das seqüências consenso geradas a partir das *contigs* 1, 2 e 3 da biblioteca PbMY, comparadas às seqüências depositadas no banco nr, utilizando a ferramenta Blastx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
cDNA	Seqüência de DNA complementar
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxirribonucleotídeos 5'-trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i> (Etiqueta de Seqüência Expressa)
g	Grama
G	Força gravitacional
H	Hora
L	Litro
M	Molar
mA	Miliamperes
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Massa molecular
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MVM	Meio de cultura Mac Veigh-Morton
ng	Nanograma
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	picomoles
p/v	peso/volume
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto

RT	Transcrição Reversa
RT-PCR	Transcrição Reversa - Reação em cadeia da polimerase
SDS	Sódio dodecil sulfato
TA	Temperatura ambiente
TE	Tampão Tris-EDTA
TEB	Tampão Tris-EDTA-borato
Tris	Tri(hidroximetil)aminometano
U.E.	Unidade enzimática
UV	Radiação ultravioleta
v	Volume
V	Volts
YPD	Meio de cultura <i>Yeast-Peptone-Dextrose</i>
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
%	Por Cento

RESUMO

O fungo patogênico e dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose, a micose sistêmica de maior prevalência na América do Sul. O fungo ocorre na natureza na forma de micélio, na temperatura de 26°C, e na forma de levedura, na temperatura de 37°C *in vitro*, sendo esta a forma encontrada nos tecidos de hospedeiros. A transição dimórfica da forma miceliana para a de levedura parece ser essencial para a patogênese, como também observado para outros fungos patogênicos e dimórficos.

O projeto “Genoma Funcional e Diferencial do Fungo *P. brasiliensis*”, realizado sob coordenação de nosso laboratório, foi empreendido a partir do seqüenciamento de bibliotecas de cDNA das formas de micélio e levedura cultivadas *in vitro*. No contexto desse trabalho, foi construída uma biblioteca de cDNA a partir do RNA total de *P. brasiliensis* obtido após seis horas de co-cultivo com células de macrófagos peritoneais murinos, sem qualquer cultivo adicional do fungo *in vitro*. A análise do perfil transcricional desse fungo a partir dessa biblioteca de cDNA, denominada PbY-MΦ, visa melhor compreender o padrão de expressão de genes potencialmente importantes para a adaptação e sobrevivência de *P. brasiliensis* no modelo de infecção.

Nesse sentido, esse trabalho iniciou a caracterização do transcriptoma de *P. brasiliensis* recuperado de macrófagos, pelo seqüenciamento de cDNAs da biblioteca PbY-MΦ. A partir da submissão das seqüências ao *pipeline* de análise, um total de 474 ESTs de qualidade (PHRED ≥ 20 e tamanho ≥ 100 nt), foram geradas e analisadas. Após agrupamento pelo CAP3, essas ESTs foram agrupadas em 16 *contigs* e 99 *singlets*. Análises de similaridades empregando os bancos de dados do projeto transcriptoma de *P. brasiliensis*, GeneBank nr e dbEST, utilizando as ferramentas Blastn e Blastx, foram realizadas. Os resultados dessa análise revelam que 355 ESTs, agrupadas em 4 *contigs* e 16 *singlets*, apresentaram similaridades com seqüências já descritas para o fungo *P. brasiliensis*, sendo a maioria relacionada com genes da maquinaria traducional mitocondrial. Cinco *contigs* e sete *singlets*, ainda não descritos em *P. brasiliensis*, apresentaram similaridades com seqüências de outros organismos, sendo que a maioria também mostrava similaridade com genes mitocondriais que codificam proteínas da cadeia de transporte de elétrons. Das 474 ESTs analisadas no contexto desse trabalho, seis *contigs* e 63 *singlets* não apresentaram similaridades com

nenhuma seqüência descrita nos bancos de dados empregados nessa análise, correspondendo a genes novos potencialmente específicos de *P. brasiliensis*.

Em adição, nesse trabalho também foi realizada a análise de quatro *contigs* que apresentam similaridades com o gene de isocitrato liase (*icl*), o qual codifica uma proteína chave do ciclo do glioxilato, que mostra-se ativado em diferentes modelos de células de mamíferos infectadas por patógenos intracelulares facultativos. Essas *contigs* foram identificadas no transcriptoma de *P. brasiliensis* cultivado *in vitro*. Nesse sentido, foram realizados o seqüenciamento adicional de clones de cDNAs relacionados a essas *contigs*, análises de similaridade dessas seqüências e experimentos de *Southern blot*. Os resultados sugerem que três *contigs*, apresentando similaridade com uma mesma seqüência de isocitrato liase do fungo *Coccidioides immitis*, representam provavelmente um mesmo transcrito de *P. brasiliensis*, enquanto a quarta *contig* apresenta maior similaridade com o gene metilisocitrato liase do fungo *Emericella nidulans*.

ABSTRACT

The dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the causative agent of paracoccidioidomycosis, the most prevalent systemic mycosis in Latin America. Dimorphic transition is triggered by a temperature shift from the environmental 26 °C, in which the fungus is found as a free-living mycelium, to the 37 °C of the human host, when it changes to the pathogenic yeast form. The dimorphic transition is believed to play an essential role in pathogenesis, as described for other dimorphic pathogenic fungi. The project "Functional and Differential Genomics of the *P. brasiliensis* fungus", coordinated by our laboratory, has performed the sequencing of cDNA libraries from *in vitro* grown yeast and mycelium cells, resulting in 19,718 expressed sequence tags (ESTs) from *in vitro* cultivated yeast (9,941 ESTs) and mycelium (9,777 ESTs). The CAP3 clusterization software has assembled these raw sequence data into 2,655 contigs and 3,367 singlets.

In order to better understand the expression of genes potentially involved in *P. brasiliensis* adaptation and survival in an infection model, in this work we describe the construction of a cDNA library using as template mRNA extracted from a six-hour co-culture of *P. brasiliensis* yeast cells and murine peritoneal macrophages, named PbY-M Φ . The sequencing of the PbY-M Φ library generated 474 ESTs that suited inclusion criteria of PHRED \geq 20 and size greater than 100 nucleotides, which were clustered into 16 contigs and 99 singlets. BLAST-analysis against the *P. brasiliensis* transcriptome project, nr and dbEST databases, grouped 355 ESTs into four contigs and 16 singlets similar to previously described *P. brasiliensis* sequences, most of them corresponding to components of the mitochondrial translation apparatus. Five contigs and seven singlets, which were not described in *P. brasiliensis*, were found to be similar to sequences described in other organisms, with most of them implicated in the mitochondrial electron transport chain. Six contigs and 63 singlets were unique in that they had no homology to known sequences.

In addition, we have performed a better characterization of four contigs described in the *in vitro* transcriptome, which were similar to the isocitrate lyase gene (*icl*), an enzyme of the glyoxylate cycle. Sequencing, similarity analysis and southern blotting experiments of these contigs suggest that three of them correspond to the isocitrate lyase from *Coccidioides immitis*, while the fourth is related to a methyl-isocitrate lyase gene from *Emericella nidulans*.

1- INTRODUÇÃO

1.1 O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* e a paracoccidioidomicose

Paracoccidioides brasiliensis, o agente etiológico da paracoccidioidomicose é um fungo dimórfico encontrado na natureza como micélio na temperatura entre 23°C e 26°C, e na forma de levedura à temperatura de 37°C o tipo celular encontrado nos tecidos de hospedeiros. A transição entre as duas formas é desencadeada pela temperatura, e é um aspecto essencial para o estabelecimento da infecção do hospedeiro. Acredita-se que a forma miceliana no ambiente natural produza conídios que funcionariam como propágulos aéreos, que ao serem inalados chegariam aos pulmões, onde sofreriam transição dimórfica para a forma de levedura, assim procedendo a infecção (revisto por Restrepo *et al.*, 2001).

A forma de micélio de *P. brasiliensis* cresce a 26°C, produzindo por crescimento apical hifas alongadas, freqüentemente ramificadas e septadas apresentando entre 1-3µm de diâmetro. As hifas são multicelulares apresentando apenas um núcleo, enquanto os conídios unicelulares na maioria são uninucleados, porém algumas vezes apresentam-se binucleados. As leveduras são unicelulares e multinucleadas, sendo a sua forma arredondada a oval, com tamanho variando entre 4 a 30µm. A principal característica da forma de levedura é a aparência designada como “roda de leme”, onde células-filha em brotamento aparecem aderidas em torno da célula-mãe (Franco *et al.*, 1989; Lacaz *et al.*, 1991).

De acordo com comparações filogenéticas baseadas em seqüências do RNA da subunidade ribossomal maior, *P. brasiliensis* é classificado como pertencente ao grupo ascomiceto (filo Ascomycota) membro da ordem Onygenales da família Onygenaceae, juntamente com outros fungos dimórficos e patogênicos como *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis* (revisto por Guarro *et al.*, 1999). O tamanho do genoma nuclear definido por *Pulse-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) é em torno de 30 Mb, com 4-5 cromossomos variando entre 2 e 10 Mb em tamanho (Montoya *et al.*, 1997). O fungo *P. brasiliensis* contém em torno de 7500 e 9000 genes, o que está de acordo com o número de genes sugeridos para genomas de fungos ascomicetos já seqüenciados. A falta de um ciclo sexual conhecido tem dificultado o estudo da genética de *P. brasiliensis*, resultando em um menor conhecimento de importantes processos como

dimorfismo, virulência e patogenicidade (Felipe *et al.*, 2003 e 2005). Estudos filogenéticos realizados por Matute e colaboradores (2006), descrevem a existência de pelo menos três espécies crípticas para *P. brasiliensis*: S1 (Espécie 1), SP2 (Espécie filogenética 2) e SP3 (Espécie filogenética 3). Sendo o grupo SP composto de isolados do Brasil e Venezuela, enquanto o grupo SP3 de isolados apenas da Colômbia. Além disso, os autores sugerem que pelo menos um desses grupos de isolados, o S1 apresenta reprodução sexuada. Trabalhos recentes abordando comparações entre diferentes isolados de diferentes pacientes em diferentes formas clínicas e de diferentes origens geográficas sugerem a existência de isolados diplóides, haplóides e também consideram a existência de isolados aneuplóides (Feitosa *et al.*, 2003).

Embora *P. brasiliensis* tenha sido isolado ocasionalmente do solo, seu habitat natural não foi determinado precisamente (Silva-Vergara *et al.*, 1998). Esforços têm sido feitos para determinar seu micro-nicho e neste sentido, condições geoclimáticas das regiões onde o fungo foi encontrado foram determinadas: o habitat do fungo prevalece em áreas de temperaturas amenas (17-27° C), clima úmido com pluviosidade entre 1750-2500 mm, vegetação abundante e existência de cursos de água (Borelli, 1961; Restrepo & Espinal, 1968). Outras circunstâncias relacionadas ao aparecimento do fungo, como a atividade econômica local, exploração da terra e a respectiva devastação da vegetação nativa vêm sendo consideradas (Restrepo, 1985; Mangiaterra *et al.*, 1999).

Por muito tempo acreditou-se que o homem fosse o único hospedeiro do fungo, contudo, dados recentes confirmam a presença de *P. brasiliensis* em tatus da espécie *Dasyopus novemcinctus* infectando pulmões, baço, fígado e/ou nódulos linfáticos (Bagagli *et al.*, 1998; Silva-Vergara & Martinez, 1999). Estes mesmos autores descreveram a formação de granulomas em torno de células de leveduras no baço ou pulmões, indicando que *D. novemcinctus* possa desenvolver paracoccidiodomicose e não apenas ser um reservatório. A distribuição de *D. novemcinctus* coincide com a prevalência da paracoccidiodomicose e com as características ambientais da presença do fungo: presença de vegetação alterada, temperaturas amenas e abundância de cursos de água (Forjaz, 1989; Bagagli *et al.*, 1998). Amostras de *P. brasiliensis* isolados de tatus *D. novemcinctus* parecem ser iguais aos isolados de humanos, quando comparados em termos de virulência, antígenos e aspectos moleculares por meio do perfil eletroforético do cromossomo (Montoya *et al.*, 1999; Sano *et al.*, 1999). Diversos isolados clínicos de *P. brasiliensis* oriundos de tatus foram separados dentro dos grupos I e II, com 2 subgrupos cada, e um terceiro grupo (III) com três subgrupos. Correlações

entre isolados de humanos e de tatus foram observados em grupos I e II, enquanto o grupo III consiste apenas de isolados de tatus (Sano *et al.*, 1999).

Devido à característica da paracoccidiodomicose poder ter um longo período de latência e progresso infeccioso lento podendo chegar a décadas para o desenvolvimento da doença, o registro de áreas endêmicas para a localização de *P. brasiliensis* torna-se muito difícil. A área endêmica da paracoccidiodomicose estende-se do México (23°N) a Argentina (35°S), sendo a região de maior prevalência da América do Sul os países Brasil, Venezuela e Colômbia, enquanto nos países Chile, Nicarágua e Guiana não há relatos de casos confirmados (Restrepo, 1994, Wanke & Londero, 1994). Estima-se que 10 milhões de pessoas tiveram contato com o fungo, sendo que provavelmente apenas 2% desenvolva algum tipo de forma sintomática. Porém, uma vez que a paracoccidiodomicose não é uma doença muito notificada, a real prevalência e incidência pode não estar calculada corretamente (Restrepo *et al.*, 2001; Coutinho *et al.*, 2002).

Existem basicamente duas formas da doença paracoccidiodomicose: a forma aguda (tipo juvenil) e a forma crônica (tipo adulto), cujos critérios de classificação estão resumidos na tabela 1 (revisado por Brummer *et al.*, 1993). A forma aguda representa 3% dos casos, ocorrendo principalmente em crianças, sendo caracterizada por um rápido desenvolvimento da infecção, que pode variar de semanas a meses. Esta é a forma mais severa e apresenta altas taxas de mortalidade. É marcada pela hipertrofia do sistema reticuloendotelial e disfunção da medula óssea vermelha, levando freqüentemente para uma desordem linfo-hipertrófica (Camargo & Franco, 2000). A forma adulta ou crônica ocorre em cerca de 90% dos pacientes, atingindo principalmente adultos, apresenta progressão mais lenta, que pode levar anos ou décadas para se tornar totalmente estabelecida. Diferente da forma aguda, a forma crônica ou adulta atinge primariamente os pulmões, 25% dos casos ficam restritos neste órgão, provocando o aparecimento de seqüelas de natureza fibrótica, o que pode comprometer o bom funcionamento do mesmo. Subseqüentemente, a doença pode disseminar para outros órgãos, formando lesões secundárias em mucosas, pele, linfonodos e glândulas adrenais (Abad *et al.*, 1986; Londero & Ramos, 1990).

Em ambos os casos a defesa é principalmente mediada por resposta imune-celular e o tratamento é usualmente prolongado. As drogas mais usadas são os derivados de azóis (cetoconazol e itraconazol), os quais interferem na síntese do ergosterol, componente da membrana celular do fungo. Contudo, embora os azóis e outras drogas

possam parar o progresso da doença, a seqüela fibrótica persiste além de não eliminarem definitivamente o fungo, o qual pode permanecer viável e provavelmente constituir uma fonte para um novo surto da paracoccidioomicose. Em *P. brasiliensis* não é incomum o retorno da infecção décadas após o fim do tratamento. Além disso, o tratamento pode apresentar as desvantagens de normalmente causarem uma série de efeitos colaterais aos pacientes (revisto por Brummer *et al.*, 1993).

Tabela 1. Principais características clínicas, imunológicas e histopatológicas das formas aguda, sub-aguda e crônica da paracoccidioomicose.

	Forma aguda ou sub-aguda (juvenil)	Forma crônica (do adulto)
Idade do paciente	Inferior a 30 anos	Acima de 25 anos
Quadro clínico típico	Adenomegalia cervical ou generalizada	Pneumopatia e/ou ulceração na mucosa bucofaringea
Alterações e lesões adicionais mais freqüentes (presentes ou não)	Hepatomegalia, esplenomegalia, lesão de pele, mucosa bucofaringea, intestinal, óssea	Adenomegalia submandibular e/ou cervical, lesão de pele, de laringe, de supra-renais e de sistema nervoso central.
Anticorpos anti-<i>P. brasiliensis</i>	Títulos altos	Títulos médios a altos
Imunidade celular e hipersensibilidade retardada	Depressão moderada a intensa	Preservada ou depressão moderada
Histopatologia	Granulomas frouxos Muitas leveduras Evolução para necrose e supuração	Granulomas compactos Menor número de leveduras Evolução para necrose e fibrose.

(Martinez, 2004)

Dados confirmam que existe uma grande diferença na relação de infectados entre os sexos. A paracoccidioomicose tem maior prevalência em indivíduos do sexo masculino, com uma diferença em torno de 13:1, podendo alcançar mais de 78:1 como relatado na Colômbia (Restrepo, 1994). Contudo, relatos indicam que considerando mulheres em idade anterior a menarca e durante a menopausa, a proporção de infecção entre os dois sexos é de 1:1. Estes dados levam à hipótese segundo a qual fatores hormonais possam ter um papel no desenvolvimento dessa patogênese (Loose *et al.*, 1983; Restrepo *et al.*, 1984).

O sistema hormonal do hospedeiro pode modular tanto o crescimento quanto o dimorfismo do patógeno, o que pode influenciar na patogênese, conforme relatado em fungos como *Candida albicans* (White & Larsen, 1997), *C. immitis* (Powell & Drutz, 1984) e *P. brasiliensis* (Clemons *et al.*, 1989). Em *C. albicans*, níveis fisiológicos de 17-β-estradiol induzem fortemente o crescimento do tubo germinativo, favorecendo a

formação de hifas e a infecção (White & Larsen, 1997). Em *C. immitis* os hormônios progesterona, testosterona e o 17- β -estradiol, este último especialmente de uma maneira dose dependente, estimula o crescimento do fungo *in vitro*, acelerando a taxa de maturação da esférula e a liberação de endósporos (Powell & Drutz, 1984). Em *P. brasiliensis* há comprovações que 17- β -estradiol bloqueia a transição *in vitro* de micélio e/ou conídio para levedura, provavelmente devido à ação de uma proteína citosólica ligante de estrógeno produzida pelo fungo (Restrepo *et al.*, 1984; Aristizabal *et al.*, 1998).

Muitos indivíduos infectados desenvolvem apenas a paracoccidiodomicose assintomática ou sub-clínica, a qual algumas vezes progride para uma doença com uma diversidade de formas clínicas, dependendo de fatores do hospedeiro, diferenças nos níveis de virulência do fungo e condições ambientais (Franco, 1987). Não existem evidências de que a paracoccidiodomicose seja contagiosa entre os homens e é aceito que diferentes isolados de *P. brasiliensis* diferem em sua habilidade em causar doença em humanos (Restrepo-Moreno, 1993; Soares *et al.*, 1995).

Uma importante característica de vários fungos patogênicos ao homem é a sua inerente capacidade de mudar sua morfologia de uma forma filamentosa multicelular para uma forma de levedura unicelular quando infecta tecidos hospedeiros. Tal processo é referido como dimorfismo, uma propriedade genética intrínseca de fungos. Como por exemplo, podemos citar os importantes patógenos humanos *Histoplasma capsulatum*, *B. dermatitidis* e *P. brasiliensis* (revisto por San-Blas *et al.*, 2002). Para *C. albicans*, um fungo oportunista presente na microbiota normal, o processo de transição dá-se ao contrário do mencionado acima, ocorrendo a mudança da forma de levedura, não associada diretamente à patogênese, para a forma de pseudohifa relacionada mais freqüentemente a candidíase. A habilidade de fungos patogênicos dimórficos em alterar entre diferentes tipos morfológicos parece ser um importante determinante de virulência, uma vez que linhagens incapazes de fazer esta transição morfológica têm reduzida capacidade de virulência ou são avirulentos. Em *C. albicans*, mutantes *cph1* e *efg1*, genes da via de sinalização pelos *mitogen activated protein kinases* (MAPKs), a qual tem papel fundamental no dimorfismo são incapazes de crescer na forma filamentosa e apresentam a capacidade invasora diminuída, além de serem avirulentas em modelos de infecção em camundongos (Lo *et al.*, 1997).

Embora para fungos como *C. albicans* o processo de transição dimórfica envolva a necessidade de diversos fatores como a disponibilidade de nutrientes, pH, contato com células do hospedeiro e temperatura, para *P. brasiliensis* cultivados *in vitro*, a mudança da temperatura é suficiente para a morfogênese de micélio (26°C) para a forma de levedura (37°C) ou vice-versa.

Em consequência do dimorfismo, uma série de alterações é observada, como por exemplo, as diferenças na composição da parede celular entre os diferentes tipos celulares. A parede celular de fungos é uma estrutura complexa composta principalmente por quitina e glicana. Devido à necessidade de sua manutenção durante a esporulação, na divisão celular em leveduras, na formação de hifas em micélios, e na sua integridade em ambiente inóspitos como em fagossomos de células hospedeiras, a parede celular de fungos é conceitualmente uma das estruturas do patógeno mais atrativa como alvo para terapias antifúngicas (revisto por Kellner *et al.*, 2005). Exemplos são as equinocandinas e pneumocandinas, uma classe de drogas antifúngicas que inibem a síntese de β -1,3-glicana (revisto por Debono *et al.*, 1994).

Na levedura *S. cerevisiae* a β -1,3-glicana é o principal componente da parede celular, a qual é sintetizada β -1,3-glicana sintase (GS). Esta enzima é composta por uma subunidade catalítica codificada pelos genes *FKS1* e *FKS2*, e uma subunidade regulatória codificada pelo gene *RHO1*. A dupla deleção de *FKS1* e *FKS2* é letal ao fungo, embora deleções simples sejam viáveis, sugerindo a sobreposição funcional dos dois genes (Sekiya-Kawasaki *et al.*, 2002). Homologia de *FKS1* tem sido relatada em fungos patogênicos como *C. albicans* (Douglas *et al.*, 1997) e *P. brasiliensis* (Pereira *et al.*, 2000), bem como em outros fungos filamentosos como *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus fumigatus* (Beauvais *et al.*, 2001).

Entre os principais componentes da parede celular de *P. brasiliensis* estão os polissacarídeos α -1,3-glicana e β -1,3-glicana. A proporção da composição destes polissacarídeos tem mostrado ser essencial para sua virulência do fungo. A α -1,3-glicana sintase tem sido proposta como um importante fator de virulência em *P. brasiliensis*. Culturas *in vitro* por longos períodos têm resultado na diminuição da parede celular, baixos níveis de α -1,3-glicana e perda da virulência (revisto por San Blas & San Blas, 1977). O polissacarídeo β -1,3-glicana tem sido implicado como um importante modulador da resposta imune do hospedeiro (Restrepo-Moreno, 1993). A síntese *in vitro* de β -1,3-glicana pela β -1,3-glicana sintase, a qual está ancorada na

membrana plasmática, requer UDP-glicose como o precursor nucleotídico preferido, enquanto uma pequena proteína ligadora a GTP, Rho1, funciona como um componente regulatório de β -1,3-glicana sintase em leveduras de brotamento e fissão (Sorais-Londález & San-Blas, 1990).

Em todos os fungos patogênicos, a quitina representa outro importante principal componente estrutural da parede celular com função na diferenciação, integridade da parede celular, ancoramento de moléculas chaves como adesinas e fatores de virulência (Wang & Szaniszló, 2000; Brandhorst & Klein, 2000). A síntese de quitina é um processo complexo regulado por várias isoenzimas sintases, algumas delas redundantes. Em *P. brasiliensis*, ocorrem quatro genes de quitina sintase representando cinco classes dessas enzimas, *PbrCHS1* (classe I), *PbrCHS2* (classe II), *PbrCHS3* (classe IV) e *PbeCHS5* (classe V) (Niño-Vega *et al.*, 1998 e 2000). Estas enzimas participam da síntese de quitina em quantidades que compreendem 43% do peso seco da parede celular na forma de levedura e 13% na forma miceliana (San-Blas *et al.*, 1994).

Todos os organismos, quando submetido a condições de estresse, como o aumento de temperatura ou exposição a agentes químicos, respondem com o aumento dos níveis de expressão de genes que codificam proteínas de choque térmico (HSP) (Morimoto *et al.*, 1994). Durante o processo de infecção por *P. brasiliensis*, alterações do ambiente como a mudança de temperatura, de 26°C para 37°C, ou o contato com o ambiente do fagossomo das células de macrófago, induz o fungo às respostas ao estresse. Em *P. brasiliensis*, um dos mecanismos mais bem estudados na resposta à alteração da temperatura é a expressão de genes *hsp70*, os quais são expressos diferencialmente durante a transição de micélio para levedura (da Silva *et al.*, 1999). Os níveis dos transcritos *hsp70* se elevam após 30 minutos a 6 horas da troca de temperatura de 26° para 37°C, e com uma redução após 36-48 horas (Florez *et al.*, 2003). No transcriptoma diferencial das formas de micélio e levedura de *P. brasiliensis*, o perfil transcricional dos genes *hsp* parece relacionar bem com as possíveis necessidades de resposta dos diferentes tipos celulares às diferentes condições ambientais (Felipe *et al.*, 2005).

Em fungos, as vias de sinalização por MAPK, cAMP e Ca^{2+} /Calmodulina, estão envolvidas em diversos eventos relacionados à virulência. Em *P. brasiliensis*, a via MAPK controla o desenvolvimento filamentoso, a regulação osmótica e a manutenção da integridade da parede celular (Felipe *et al.*, 2005). Entre os componentes desta via de sinalização, as proteínas da família Rho têm papel fundamental na regulação das

enzimas da síntese de β -1,3 glicana, componente principal da parede celular da forma de micélio (revisto por Lengeler *et al.*, 2000). A via de sinalização cAMP e Ca^{2+} /Calmodulina, responsáveis por diversos eventos como a regulação na diferenciação do fungo, são em particular, vias de sinalização importantes na virulência de *P. brasiliensis*. Carvalho e colaboradores (2003) demonstraram que drogas, como a calmidazolium e trifluperozina, as quais bloqueiam a via da Ca^{2+} /Calmodulina, inibem a transição dimórfica de *P. brasiliensis* da forma miceliana para levedura. Em adição, o aumento nos níveis de cAMP durante a transição para a forma de levedura foi relatada por Paris e Duran (1985). Ambos os trabalhos demonstram a estreita relação entre as duas vias na diferenciação, sendo este um processo essencial para o estabelecimento da patogênese, do fungo *P. brasiliensis*.

1.2 A interação patógeno-hospedeiro

O resultado da interação patógeno-hospedeiro é determinado pela natureza dos danos que resultam desta relação, bem como a resposta imune específica ao microrganismo (Casadevall & Pirofski, 1999). Células fagocitárias do sistema imune inato, tais como macrófagos e neutrófilos, são a primeira linha de defesa contra infecções microbianas. Pacientes com problemas de imunidade inata, como doenças granulomatosas crônicas ou neutropenia, são extremamente susceptíveis a uma enorme variedade de infecções (revisto por Lorenz & Fink, 2002). A capacidade de um microrganismo causar doenças em indivíduos com imunidade aparentemente normal é um indicativo da capacidade do microrganismo em evadir a defesa normal do hospedeiro. De forma que, resistências a infecções causadas por fungos patogênicos intracelulares facultativos como *C. albicans*, *H. capsulatum*, *C. immitis*, *B. dermatitidis* e *P. brasiliensis*, estão associadas a uma resposta imunológica celular eficiente (Romani, 1999).

A resposta imune celular representa o principal mecanismo de defesa contra infecções causadas por *P. brasiliensis*. Formas severas de paracoccidiodomicose são caracterizadas por distúrbios imunológicos como alterações na razão de sub-populações de linfócitos T, hipersensibilidade do tipo tardia prejudicada, produção de citocinas que inibem o desenvolvimento de uma resposta imune celular efetiva e provavelmente um efeito supressor dos componentes do fungo na proliferação celular do sistema imune (Bava *et al.*, 1991; Benard *et al.*, 1996; Marques *et al.*, 2002). A estimulação de

produção de células supressoras e suas citocinas relacionadas também têm sido demonstradas como um mecanismo usado por *P. brasiliensis* para evadir da resposta imune celular do hospedeiro. Jimenez-Finkel & Murphy (1988) demonstraram que a inoculação intravenosa de cultura do fungo em um modelo experimental de camundongos induziu o início de atividade supressora por células T por meio de uma demorada resposta de hipersensibilidade.

Por meio de estudos histopatológicos seqüenciais obtidos em estudos experimentais em modelo de camundongo, tornou-se possível dividir o processo inflamatório crônico granulomatoso na paracoccidiodomicose em três fases distintas: **fase monocítica-neutrofílica-** a fase inicial da formação do granuloma na paracoccidiodomicose experimental depende principalmente do componente polissacarídeo β -glicana da parede celular da levedura, o qual demonstrou uma capacidade de atração e organização concêntrica de macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares ao foco inflamatório. A interação desses fagócitos com os polissacarídeos da parede do fungo induz a secreção de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que estimula a migração e diferenciação dos monócitos (Figueiredo *et al.*, 1993); **fase pré-granulomatosa-** nessa fase ocorre mobilização de mais macrófagos para o sítio inflamatório, os quais tendem a sofrer diferenciação para as chamadas células epitelióides (núcleo alongado e citoplasma expandido) e fundir seus citoplasmas formando as células gigantes, caracterizando um granuloma do tipo epitelióide; **fase granulomatosa-** a qual infiltrados de linfócitos T são detectados ao redor do granuloma, sendo que a maioria destes linfócitos tem fenótipo CD4+ e alguns CD8+ (Franco *et al.*, 1993).

O macrófago é a principal célula componente do granuloma e vários estudos clínicos e experimentais sugerem que macrófagos ativados pelos linfócitos T têm papel fundamental na resistência ao *P. brasiliensis*. Para uma colonização efetiva, o fungo necessita resistir às ações microbicidas de células leucocitárias efetoras. Quando *P. brasiliensis* alcança o alvéolo pulmonar, o fungo interage com macrófagos alveolares que liberam peptídeos que atraem neutrófilos para o foco de infecção, amplificando a resposta celular (Cano *et al.*, 1992). Quando ativados por interferon- γ (IFN- γ) e/ou outras linfocinas, os macrófagos tornam-se capazes de fagocitar *P. brasiliensis* (Brummer *et al.*, 1988; Moscardi-Bacchi *et al.*, 1989). Já as distintas sub-populações de células T auxiliares estimulam diferentes vias de resposta imune. A imunidade para *P.*

brasiliensis pode ser regulada por subconjuntos de linfócitos Th1 ou Th2, os quais irão determinar o tipo de infecção (San-Blas & Nino-Vieira, 2001).

Linfócitos do tipo Th1 são essenciais para uma resposta imune celular efetiva contra patógenos intracelulares, devido à secreção de IFN- γ que ativa macrófagos e IL-2 que estimula a proliferação de células T CD8+ (citotóxicas). Em camundongos, o IFN- γ também induz a produção de subclasses de imunoglobulinas G (IgG2a e IgG3), as quais contribuem para imunidade antimicrobiana por meio de suas atividades acentuadas de fixação de complemento e opsonização. Em sinergia com TNF- α o IFN- γ induz a síntese de óxido nítrico proporcionando um aumento significativo da função microbicida dos macrófagos. Ademais, o TNF- α é essencial para migração de monócitos e sua diferenciação em um foco inflamatório, como o granuloma. O IFN- γ ainda é essencial para formação de reações de hipersensibilidade tardia efetiva. Já os linfócitos Th2 produzem citocinas (IL-4 e IL-5) controladoras da ativação e diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, demonstrando a sua importância na indução da resposta imune humoral (Powrie *et al.*, 1993; Seder & Paul, 1994).

Outro componente importante na defesa contra *P. brasiliensis* é o óxido nítrico (NO), um radical livre, altamente reativo e extremamente lábil. A produção de NO realizada pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em macrófagos é considerada como o principal mecanismo microbicida, já que os reativos intermediários de oxigênio, também produzidos por macrófagos ativados, não são capazes de destruir o fungo (Hibbs *et al.*, 1988). iNOS é expresso em resposta a citocinas pró-inflamatórias (Tipo 1) por meio de regulação transcricional principalmente por IFN- γ , TNF- α e IL-1 β e/ou produtos microbicidas como constituintes polissacarídeos da parede celular (Bogdan, 1999).

Estudos empregando modelos experimentais de células de macrófagos de mamíferos, demonstram que a atividade microbicida dos macrófagos relaciona-se com a produção de NO e seus metabólitos, chamados coletivamente de reativos intermediários de nitrogênio (RIN). Os RINs são gerados a partir da interação de NO com outras moléculas, como o íon superóxido (O_2^-), que resulta na produção de um composto altamente reativo, o peroxionitrito (ONOO-) que, subsequentemente, decompõe-se em moléculas adicionais também altamente reativas. Os RINs causam uma variedade de alterações no DNA incluindo quebras de fitas e desaminação, enquanto que em proteínas causam modificações que envolvem nitrosilação de resíduos de cisteína e

tirosina além de inativação de enzimas com núcleo ferro-enxofre (Kerwin *et al.*, 1995). Essas modificações podem afetar enzimas metabólicas vitais, proteínas da cadeia respiratória da mitocôndria e síntese de DNA, causando efeitos citostáticos e citotóxicos *in vitro* e *in vivo*, contra uma grande variedade de microrganismos, incluindo *Schistosoma mansoni* (James *et al.*, 1989), amastigotas de *Leishmania major* (Liew *et al.*, 1990), *Trypanosoma cruzi* (Norris *et al.*, 1995), *Cryptococcus neoformans* (Lee *et al.*, 1994), *Histoplasma capsulatum* (Lane *et al.*, 1994), a forma de hifa de *Candida albicans* (Blasi *et al.*, 1995), a forma de levedura de *Penicillium marneffeii* (Kudeken *et al.*, 1998), *Mycobacterium tuberculosis* (Chan *et al.*, 1995), entre outros. Gonzales e colaboradores (2000) avaliaram a ação de NO produzidos por macrófagos peritoneais murinos ativados por IFN- γ em conídios de *P. brasiliensis* e relataram que NO inibem o processo de transição de conídio para levedura de maneira dose-dependente.

A adesão de microrganismos patógenos ao tecido hospedeiro tem sido apontada como o primeiro e principal passo na colonização e disseminação do parasita. O fungo *P. brasiliensis* produz um antígeno, a glicoproteína gp43, a qual apresenta um alto conteúdo de manose, o que aumenta a capacidade de promover a ligação à laminina, tendo um papel essencial na disseminação do fungo (Vicentini *et al.*, 1994). Esse antígeno é estocado em grandes vesículas antes de sua secreção para o espaço extracelular (Straus *et al.*, 1996).

A internalização de microrganismos por células fagocitárias o expõe a um novo ambiente, como alterações no pH e exposição a enzimas degradativas. Embora a composição molecular do fagossomo seja pouco conhecida, é provável que esta organela seja um meio pobre em fontes de carbono na forma de glicose ou outro tipo de açúcar. Análises das respostas de patógenos internalizados por células fagocitárias proporcionam um melhor entendimento das alterações necessárias para a sobrevivência do organismo. Deste modo, perfis transcricionais de um microrganismo com o genoma bem anotado oferecem informações valiosas através de comparações dos níveis de expressão de genes necessários para sua sobrevivência neste encontro com a primeira linha de defesa do hospedeiro. Alterações na expressão gênica em microrganismos após internalização em fagossomos de células hospedeiras têm sido interpretadas como uma resposta aos sinais ambientais deste meio como a diminuição do pH, a presença de espécies reativas (estresse oxidativo) e a pouca disponibilidade de fontes de carbono, aminoácidos e outros nutrientes importantes, além de promover uma condição que parece contribuir para a virulência de alguns patógenos.

Técnicas de análise da expressão gênica em larga escala ou *highthroughput*, como *microarray*, *serial analysis of gene expression* (SAGE) e *real time* PCR, têm sido utilizados para caracterizar a resposta transcricional de fungos internalizados por células fagocitárias. O fungo *C. neoformans* sobrevive após fagocitose por macrófagos e prolifera dentro destes, estabelecendo uma infecção latente. Análise por *microarray* evidenciou aumento na expressão de múltiplos transportadores para hexoses, aminoácidos e íons metálicos de ferro, bem como genes envolvidos em respostas ao estresse oxidativo (Fan *et al.*, 2005). Em células de *C. albicans* fagocitados por macrófagos, análises de *microarray* apresentaram um desvio da via glicolítica para a gliconeogênica, mostrando uma clara indução de genes necessários para a conversão de ácidos graxos em glicose – através da via do glioxalato. Foi detectada também uma elevação dos níveis transcricionais de genes relacionados com a resposta ao estresse oxidativo, ao reparo de danos ao DNA, à biossíntese de arginina, à utilização de peptídeos e um elevado número de genes, cerca de 18% do total analisado, específicos a este modelo (Lorenz *et al.*, 2004). Ambos os modelos descritos acima apresentaram uma repressão de genes envolvidos nas funções relacionadas ao ribossomo, processamento de rRNAs e nos processos de iniciação e alongação da tradução, sugerindo uma repressão geral da maquinaria traducional. Já em *C. albicans* internalizadas por neutrófilos, a resposta transcricional é dominada por indução de genes envolvidos na biossíntese de metionina e arginina, sugerindo que este ambiente deva ser deficiente em aminoácidos (Rubin-Bejerano *et al.*, 2003). O painel descrito acima demonstra toda a reprogramação das vias metabólicas como estratégia de sobrevivência após a fagocitose por células competentes do hospedeiro.

A fagocitose, especificamente, aumenta os níveis de expressão de genes cujos produtos catalisam as etapas regulatórias do ciclo do glioxalato, bem como as proteínas acessórias relacionadas com o funcionamento desse ciclo. Esta resposta metabólica tem precedente sobre qualquer resposta ao estresse, sugerindo que a deprivação de nutrientes é um “estresse primário” ao qual o fungo deve responder. Em *S. cerevisiae* onze de quinze genes que tiveram seus níveis aumentados após fagocitose estão relacionados com o ciclo do glioxalato. Três das cinco enzimas desta via, isocitrato liase 1 (*ICL1*), malato sintase 1 (*MSL1*) e malato desidrogenase 2 (*MDH2*), tiveram sua expressão elevada pelo menos 20 vezes em relação aos níveis normais. Tiveram também seus níveis aumentados genes relacionados como a acetil coenzima A (acetil-CoA) sintase (*ACS1*), YDR384c um homólogo de reguladores da via em *Yarrowia lipolytica*, além

de vários transportadores e acetiltransferases envolvidos no tráfego de intermediários do ciclo do glioxalato e na biodegradação de ácidos graxos (Lorenz & Fink, 2001). Em um estudo baseado na técnica de DDRT-PCR, Rude e colaboradores (2002) avaliaram o perfil transcricional de *C. neoformans* infectando coelhos imunocomprometidos. Os resultados mostraram que durante este período, os níveis dos genes de *ICLI* foram elevados durante a meningite, sugerindo que a via do glioxalato é importante para a produção de energia na condição de infecção.

1.3 O projeto transcriptoma de *P. brasiliensis*

A era genômica começou no final dos anos 80. Catalisados pelo avanço na tecnologia de seqüenciamento de DNA, estudos iniciais foram principalmente projetos de grande escala para o seqüenciamento completo do genoma de certos modelos de organismos. Posteriores avanços nas técnicas de Biologia Molecular e o surgimento da bioinformática permitiram a aceleração de processos de descrição de genes através do seqüenciamento em massa e a possibilidade de análises computacionais comparativas entre genes de organismos relacionados, assegurando o grande impulso desta nova área de conhecimento dentro da Biologia (Gibas & Jambeck, 2001).

Uma diferença principal entre a genômica estrutural e funcional baseia-se na fonte do material biológico a ser submetido ao seqüenciamento automático. Enquanto a genômica estrutural seqüencia clones derivados de DNA genômico (bibliotecas genômicas), a genômica funcional seqüencia clones de uma biblioteca de cDNA construída a partir da população de mRNA presente em uma dada condição experimental. A principal vantagem da genômica estrutural consiste no potencial seqüenciamento de todas as regiões do genoma, incluindo regiões promotoras, regulatórias, entre outras. A vantagem da genômica funcional sobre a genômica estrutural está no conhecimento do perfil transcricional do organismo ou da célula em situações pontuais que podem ser de grande relevância, como transições morfológicas, patogênese, embriogênese, crescimento entre outras.

Nesta breve história, a genômica funcional de microrganismos tem se beneficiado enormemente da análise do genoma da levedura *S. cerevisiae*. Reconhecida como um modelo informativo no estudo de genética tradicional (revisto por Kumar & Snyder, 2001), o estudo comparativo do seu genoma com outros fungos patogênicos como *C. albicans*, *H. capsulatum* e *P. brasiliensis* tem direcionado a descoberta de

importantes processos biológicos nestes organismos, tais como ciclo sexual, meiose, recombinação genética e metabolismo, podendo também revelar genes envolvidos na patogênese e virulência (Felipe *et al.*, 2003 e 2005).

Os projetos de genomas funcionais têm dedicado parte de seus esforços à obtenção de *Expressed Sequence Tags* (EST), que vem mostrando ser uma estratégia rápida e eficiente na prospecção de novos genes. Neste método, uma biblioteca de cDNA é construída a partir de uma linhagem de células ou tecidos de interesse. A extração do RNA total das células, as quais foram submetidas a uma condição experimental, os mRNAs são isolados a partir da cauda de poliA⁺ e são retro-transcritos em cDNAs usando a enzima Transcriptase Reversa de origem viral. Clones contendo o cDNA são selecionados aleatoriamente e enviados para serem seqüenciados. A seqüência gerada a partir das extremidades 5' ou 3' é denominada EST (Adams *et al.*, 1991).

1.3.1. As principais ferramentas do *pipeline* de análise empregado no projeto transcriptoma de *P. brasiliensis*

Geralmente ESTs são de tamanhos pequenos, entre 200-500 pb, e representam apenas a seqüência de parte do respectivo gene completo. Como as ESTs são geradas a partir de um único seqüenciamento, um maior número de erros do tipo de deleções, substituições e inserções de bases nucleotídicas, quando comparados aos mRNAs originais, pode ser mais freqüente (Wolfsberg & Landsman, 1997). Embora o número de seqüenciamentos oriundos da estratégia de ESTs seja enorme, existiu grande controvérsia no início de sua utilização. Argumentos sugeriram que o seqüenciamento de fragmentos de cDNA causariam a perda de elementos regulatórios que poderiam ser encontrados somente no DNA genômico. O fato é que atualmente bancos de ESTs somam-se mais de 250 genomas de organismos, perfazendo mais de 62% de seqüências depositadas no GeneBank, sendo aceitos e usados pela comunidade científica para a descoberta e pesquisa de genes homólogos em diferentes organismos, mapeamento e análise de polimorfismos, investigação de processamento alternativo de mRNAs, estudos de expressão e predição gênica, identificação de moléculas candidatas a vacinas, novos alvos para drogas, ademais diversas empresas de biotecnologia manterem coleções privadas de ESTs na tentativa de assegurar a propriedade intelectual desse conhecimento (revisto por Ohlrogge & Benning, 2000).

Os resultados oriundos do seqüenciador automático são apresentados na forma de gráficos de eletroferogramas e o processo de interpretação destes gráficos é chamado de *basecalling* (Gibas & Jambeck, 2001). Um programa muito utilizado para realizar o processo de *basecalling* é o PHRED, que utiliza a programação dinâmica para gerar uma saída de dados por meio do registro da base e a probabilidade de erro correspondente a essa base (Ewing *et al.*, 1998). Estas probabilidades estão na forma de pontuações que representam a probabilidade logarítmica negativa da base, sendo quanto maior a pontuação menor a probabilidade de erro. O índice varia entre 0 a 99, onde 10 indica que a probabilidade desta base não corresponder ao registrado é de 10% (1/10), 20 indica que a probabilidade é de 1% de erro (1/100) e assim por diante (Ewing & Green, 1998).

Em projetos de seqüenciamento, devido a possibilidade de ESTs conterem além das informações da seqüência das regiões 5' ou 3' do cDNA, possuírem também seqüências relativas ao vetor no qual o cDNA estava clonado, geralmente são utilizados programas que mascaram estas seqüências indesejadas de vetores que poderiam prejudicar posteriores análises de similaridades entre seqüências. O Crossmatch é um programa que realiza comparações entre duas seqüências, e dispõe da opção para mascarar regiões em uma seqüência que sejam similares a regiões da outra seqüência. Desta forma permitindo a comparação de um conjunto de fragmentos seqüenciados contra um conjunto de seqüências conhecidas de vetores, onde as bases nucleotídicas que compõem as regiões mascaradas são substituídas pelo caractere "X" (documentação *online* disponível em <http://www.genome.washington.edu/UWGC/protocols/>).

Outra ferramenta de grande utilidade em projetos de seqüenciamento é o CAP3, um programa que realiza a montagem de uma seqüência consenso chamada de *contig*, a partir de alinhamentos múltiplos entre um conjunto de seqüências similares. O CAP3 é a terceira geração do programa de montagem de seqüências CAP. O CAP3 apresenta a capacidade de remover as regiões 5' e 3' de baixa qualidade das seqüências e utilizar os valores atribuídos às bases nucleotídicas pelo programa PHRED para computar as sobreposições dos consensos (Huang & Madan, 1999).

Vários conceitos são importantes na descrição das comparações de seqüências de nucleotídeos. A **identidade de seqüência** refere-se à presença da mesma base ou aminoácido na mesma posição em duas seqüências alinhadas. O termo **similaridade** é freqüentemente empregado nas comparações entre seqüências de proteínas, quando dois aminoácidos são considerados similares com base em suas estruturas e características

físico-químicas, sendo que geralmente a substituição de um pelo outro provavelmente afeta significativamente a estrutura ou a função da proteína. O conceito de **homologia** indica a relação evolutiva entre as seqüências, quando apresentarem uma probabilidade de compartilharem o mesmo ancestral comum. Os genes ditos como homólogos podem ser classificados como **parálogos**, que são resultado de uma duplicação gênica, onde a partir de um ancestral comum ocorreu uma duplicação e a partir deste ponto divergiram, podendo ter funções diferentes, e os genes **ortólogos**, que representam genes derivados de um ancestral comum que divergiram ao longo da evolução dos organismos, porém podendo apresentar funções similares (Baxevanis & Ouellette, 2001).

Uma vez dispondo-se da seqüência de DNA, outro problema é a sua análise com seqüências de outros organismos relacionados ou não. A construção de algoritmos de busca em bancos de dados de seqüências é um dos grandes desafios na área da bioinformática. Estes algoritmos para busca precisam apresentar as seguintes características gerais: **1) velocidade**: devido ao tamanho dos bancos de dados atuais, os programas têm que ser ágeis para processar os dados rapidamente; **2) sensibilidade**: o programa precisa informar as similaridades significantes; **3) estatísticas rigorosas**: o programa deve promover um modo para avaliar a significância dos resultados; e **4) facilidade de uso**: uma interface *Web* que possibilite que um único banco de dados público de seqüências de genoma ofereça todos os serviços por meio de uma interface uniforme e amigável aos usuários. Ferramentas de busca entre seqüências nucleotídicas ou protéicas por alinhamento como FASTA (Person, 1998) e BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1991) facilitaram e popularizaram as análises comparativas. O programa para consulta a bancos de seqüências FASTA, pertencente à família FAST, foi projetado inicialmente para pesquisar apenas seqüências de proteínas, sendo posteriormente incorporadas ferramentas de buscas de similaridades entre seqüências de DNA e comparações entre DNA e aminoácidos, quando necessário (Pearson & Lipman, 1988). O BLAST é uma família de ferramentas disponíveis na página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> para análise de similaridade entre seqüências. As buscas de similaridades entre uma seqüência a ser testada com as seqüências depositadas nos bancos de dados, são feitas a partir da identificação de fragmentos entre as duas seqüências (Altschul *et al.*, 1991).

1.3.2. Visão geral do projeto transcriptoma de *P. brasiliensis*

O nosso laboratório coordenou a rede genoma Centro-Oeste, a qual foi responsável pelo desenvolvimento do projeto “Genoma Funcional e Diferencial do Fungo *P. brasiliensis*” baseado na geração de ESTs a partir de bibliotecas de cDNAs das formas de micélio e levedura de *P. brasiliensis* crescidas *in vitro*. O projeto resultou na geração de 25.598 ESTs derivadas do seqüenciamento de clones dessas bibliotecas de cDNA selecionados aleatoriamente. A partir deste total de ESTs 19.718, sendo 9.941 da forma de micélio e 9.777 de forma de levedura, obtiveram qualidade suficiente para serem analisadas por ferramentas computacionais implementadas no *pipeline* do projeto (Fig. 1) (Felipe *et al.*, 2003; Brígido *et al.*, 2005). Após uso do *software* de clusterização CAP3, foram gerados 2.655 *contigs* e 3.367 *singlets* (Felipe *et al.*, 2003 e 2005). O transcriptoma de *P. brasiliensis* descrito com aproximadamente 6000 genes provavelmente cobriu cerca de 80% do genoma total desse fungo, cujo tamanho é estimado em cerca de 8000 genes (Felipe *et al.*, 2003 e 2005). Em adição Goldman e colaboradores (2003) descreveram uma biblioteca de ESTs da forma de levedura cultivada *in vitro* por cerca de 10 dias após recuperação de modelo de infecção em camundongos, os dados obtidos por este grupo estão depositados no banco dbEST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

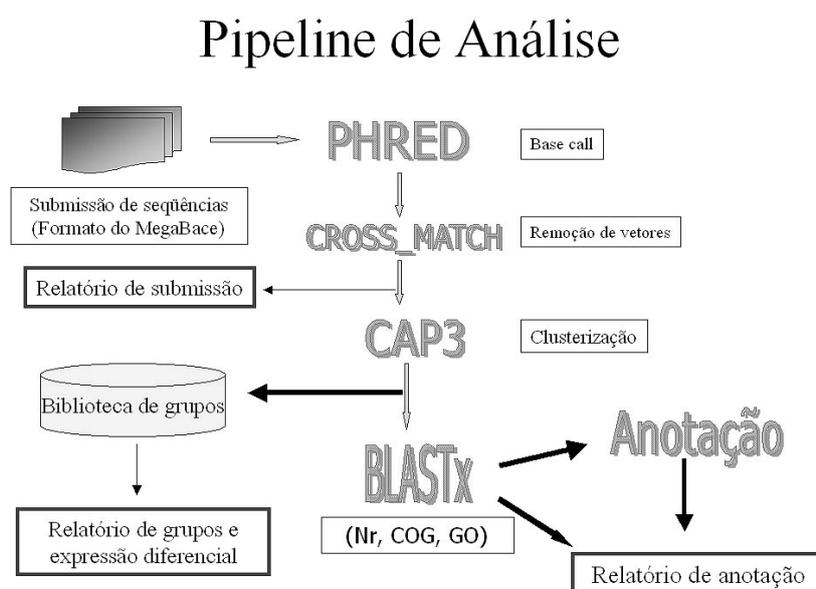


Figura 1: Esquema dos principais passos dos processos empregado para a geração e análise de ESTs do projeto “Genoma Funcional e Diferencial do Fungo *P. brasiliensis*” (Figura gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Marcelo Brígido).

A análise das seqüências de nucleotídeos obtidas para as duas formas do fungo refletiu as possíveis adaptações associadas ao ambiente, micélio no solo e levedura no tecido hospedeiro. Enquanto o perfil transcricional da forma de micélio sugere um metabolismo aeróbico, representado por ESTs que codificam enzimas do ciclo Krebs, o perfil transcricional da forma levedura evidencia um desvio para um metabolismo anaeróbico, com uma expressão aumentada de genes para álcool desidrogenase I e subunidade E1 da piruvato desidrogenase (Felipe *et al.*, 2005). Esta alteração no metabolismo está de acordo com relatos da literatura científica que sugerem um ambiente pobre em oxigênio nos fagossomos de células do tecido hospedeiro.

1.3.3 Expressão de genes do genoma mitocondrial

O genoma circular mitocondrial (mt) de leveduras apresentam um alto grau de diversidade em tamanho, organização e composição de genes. O genoma mitocondrial mais bem estudado é o da levedura *S. cerevisiae*, o qual está inteiramente seqüenciado e apresenta em torno de 80Kb de tamanho (Foury *et al.*, 1998). Muitos outros microorganismos também possuem seus genomas mitocondriais já caracterizados e comparados com o de *S. cerevisiae*, entre eles o da *Schizosaccharomyces pombe* (19kb), *C. albicans* (46kb), *Yarrowia lipolytica* (27kb), *Pichia pastoris* (27kb) e *Penicillium marneffeii* (35kb) (Koszul *et al.*, 2003; Woo, *et al.*, 2003).

A levedura *Candida glabrata* apresenta um genoma mitocondrial de 20Kb de tamanho e possui os genes *atp6*, *atp8* e *atp9*, que codificam três subunidades da ATP sintase, apocitocromo b (*cob*), *var11* e as três subunidades da citocromo c oxidase (*cox1*, *cox2*, *cox3*). Semelhantemente ao observado em *S. cerevisiae*, o genoma mitocondrial de *C. glabrata* não possui os genes que codificam para o complexo enzimático NADH desidrogenase, embora estes genes sejam encontrados no genoma mitocondrial em outras espécies de *Candida* (Koszul *et al.*, 2003). O genoma mitocondrial do fungo dimórfico *Penicillium marneffeii*, o mais importante causador de micose sistêmica humana no sudoeste da Ásia, contém genes para 15 proteínas. Estes incluem as três subunidade para ATP sintase, o gene *cob*, as três subunidade de *cox*, e sete genes para as subunidades da nicotinamida adenina (NAD) dinucleotídeo ubiquinona oxidoreductase (*nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5* e *nad6*), além das proteínas ribossomais (*rps*) (Woo, *et al.*, 2003).

Um dos complexos enzimáticos codificados no genoma mitocondrial é a citocromo c oxidase chamada também de complexo IV, localizada no final da cadeia de transporte de elétrons. Essa é responsável pelo aumento do gradiente de prótons no espaço intermembranoso da mitocôndria, que será utilizado na síntese de ATP pela enzima ATP sintase ou complexo V. A citocromo c oxidase é o maior complexo enzimático da cadeia de transporte de elétrons. Em células eucarióticas, desde fungos até mamíferos e na grande maioria das plantas, as três maiores subunidades da citocromo c oxidase são codificadas pelos genes mitocondriais *cox* (Barrientos *et al.*, 2002). Estas três subunidades compreendem o núcleo da enzima que está envolvido por várias outras subunidades codificadas por genes nucleares que são traduzidos por ribossomos citoplasmáticos e transportados para a mitocôndria graças a sinais presentes nas regiões 3' não traduzidos do mRNA (Green-Willms *et al.*, 1998). Além destas subunidades de *cox*, outros genes nucleares codificam proteínas que atuam como ativadores traducionais para as subunidades *cox1*, *cox2* e *cox3* através do reconhecimento dos sítios 5' não traduzidos dos mRNAs (Tsukihara *et al.*, 2003). Por exemplo, a tradução da *cox1* é controlada pela proteína nuclear Pet309 com a participação de Mss1p (Decoster *et al.*, 1990; Perez-Martinez *et al.*, 2003), em *cox2* o seu ativador é Pet111p, enquanto *cox3* tem sua tradução ativada por Pet494p (Green-Willms *et al.*, 2001). De forma que a taxa de síntese das proteínas mitocondriais Cox1, Cox2 e Cox3 parecem ser limitadas por seus ativadores traducionais codificados no núcleo.

Proteínas codificadas no genoma mitocondrial têm sido relatadas como importantes participantes dos mecanismos relacionados no processo de infecção por microrganismos patogênicos. A expressão diferencial de genes mitocondriais que codificam proteínas da cadeia de transporte de elétrons tem sido mostrada ser importantes na aquisição de energia quando o patógeno encontra-se internalizado em fagossomo, um ambiente relativamente pobre em nutrientes. Em adição, a mitocôndria também possui um papel fundamental no estresse oxidativo, através da expressão de genes relacionados à detoxificação de espécies reativas produzidas pelas células de macrófagos do hospedeiro. Desta forma, estudos sobre o controle da expressão de genes mitocondriais podem proporcionar um melhor entendimento sobre o contexto da interação patógeno-hospedeiro (Litter *et al.*, 2005).

1.3.4 O gene de isocitrato liase de *P. brasiliensis*

Como mostrado na figura 2, o ciclo do glioxalato consiste em um desvio do Ciclo do Ácido Cítrico, onde a enzima isocitrato liase (ICL) catalisa a clivagem do isocitrato em succinato e glioxalato. A reação seguinte consiste na condensação do glioxalato com acetil-CoA para a formação de malato pela ação da enzima malato sintase (Lehninger *et al.*, 2000). O ciclo do glioxalato vem sendo relatado em bactérias, fungos e plantas e é responsável pela utilização de compostos de dois carbonos como fonte para síntese de glicose (Lorenz & Fink, 2001). A isocitrato liase (ICL) é uma enzima chave na regulação desse ciclo e, por não estar presente em mamíferos, apresenta-se como uma promissora candidata a alvo para drogas. Além disso, a importância da ativação desse ciclo vem sendo mostrada na sobrevivência e no crescimento de diversos microrganismos patogênicos em condições de infecção de tecidos de hospedeiros (Lorenz & Fink, 2001).

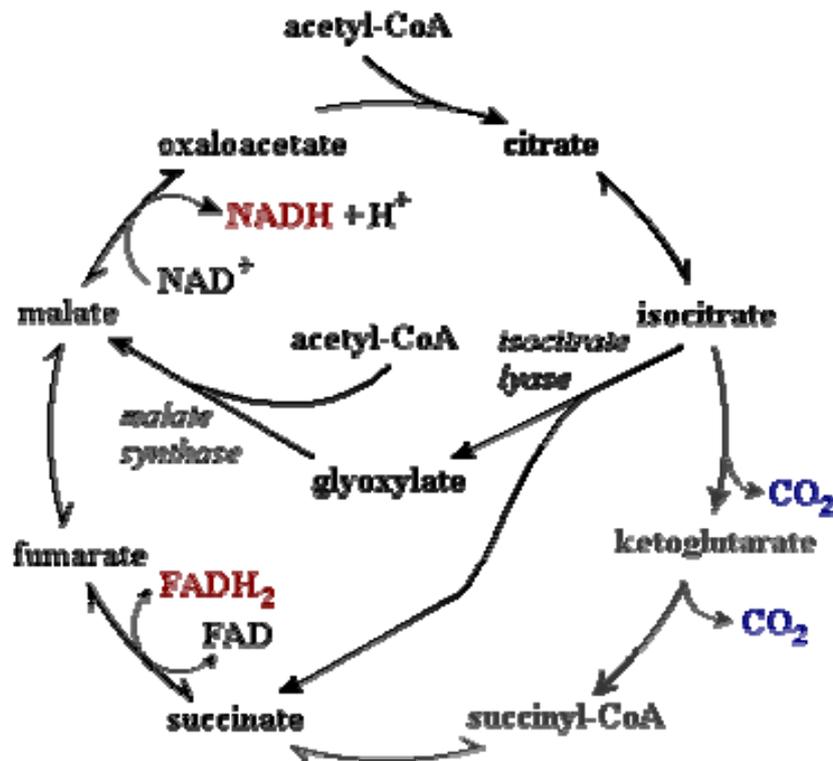


Figura 2. Esquema mostrando o ciclo do glioxalato (ciclo menor), regulado pelas enzimas isocitrato liase e malato sintase, e sua relação com o ciclo do ácido cítrico (ciclo maior).

Experimentos realizados por Lorenz & Fink (2001) com o fungo *C. albicans* mostraram que mutantes para o gene *icl* apresentaram menor virulência em camundongos quando comparados com o tipo selvagem e com o mutante reconstituído. Contudo, Rude e colaboradores (2002), apesar de terem identificado um aumento dos níveis de expressão do gene *icl* de *C. neoformans* após uma semana de infecção em coelhos imunocomprometidos, não observaram atenuação nos níveis de infecção provocada por mutantes Δicl quando comparados à infecção causada pelo tipo selvagem. Em *M. tuberculosis*, trabalhos recentes mostraram a existência de duas isoformas da enzima isocitrato liase (ICL1 e ICL2). Os mesmos autores verificaram que ambas as enzimas são necessárias para o crescimento e virulência do fungo em modelo experimental de infecção de camundongos (Muños-Elías & McKinney, 2005).

O seqüenciamento do genoma das formas de micélio e levedura do fungo *P. brasiliensis* em cultura *in vitro* permitiu um avanço no conhecimento de sua biologia. As informações nas formas de ESTs depositadas no GeneBank possibilitaram a comparação de genes diferencialmente expressos entre as duas formas do fungo, bem como o fácil acesso às seqüências de interesse para posteriores estudos. Contudo, a análise da expressão gênica de *P. brasiliensis* em um modelo de infecção pode trazer novas perspectivas na busca de potenciais genes relacionados à virulência. Com o objetivo de buscar um melhor entendimento da relação patógeno-hospedeiro, nosso grupo tem estudado o perfil de expressão de genes potencialmente relacionados à virulência de *P. brasiliensis*, os quais foram previamente descritos no projeto transcriptoma deste fungo (Felipe *et al.*, 2005). Neste sentido, o perfil de expressão de diversos genes de interesse vem sendo analisado pela técnica de *microarray* e *real time PCR*, empregando RNA extraído do fungo co-cultivado com macrófagos peritoneais murinos, sem qualquer cultivo adicional do fungo *in vitro* (tese de doutorado dos alunos Aldo Tavares e Simoneide Silva, em andamento). Dando continuidade aos resultados obtidos pelo projeto Genoma Funcional e Diferencial, a caracterização de um transcriptoma de *P. brasiliensis* na condição de infecção experimental *ex vivo* poderá trazer informações adicionais sobre a expressão de genes já descritos na cultura *in vitro*, bem como permitir a identificação de possíveis novos genes, potencialmente envolvidos na patogênese. Em adição, o projeto Transcriptoma de *P. brasiliensis* permitiu a identificação de ortólogos a genes que foram relatados como fatores de virulência em outros fungos patogênicos (Tavares *et al.*, 2005). Dentre estes, destacam-se alguns genes possivelmente importantes para a sobrevivência do microrganismo no interior de

macrófagos, tais como aqueles que codificam as enzimas regulatórias do ciclo do glioxalato (Lorenz & Fink, 2002). Nesse contexto, trabalhos recentes de nosso grupo descrevem o aumento nos níveis de expressão dos genes isocitrato liase (*icl*) e malato sintase (*mls*), tanto quando o fungo foi cultivado *in vitro* em condições de carência nutricional, como no co-cultivo de leveduras de *P. brasiliensis* com macrófagos murinos (linhagem J774). Esses resultados sugerem uma possível ativação do ciclo do glioxalato no processo de infecção, contribuindo para a adaptação do fungo ao ambiente hostil encontrado no interior de células fagocitárias (Derengowski, 2006). Dessa forma, a melhor caracterização do gene *icl* de *P. brasiliensis*, descrita neste trabalho, visa a contribuir para um maior entendimento do papel do ciclo do glioxalato na sobrevivência de *P. brasiliensis* no tecido hospedeiro.

2 - OBJETIVOS

1. Analisar comparativamente a expressão de genes de *P. brasiliensis* após 6 horas de co-cultivo em presença de células de macrófagos peritoneais murinos, com os dados obtidos pelo projeto transcriptoma desse fungo cultivado *in vitro*, e os dados depositados no Genbank nr e dbEST de outros microrganismos.
2. Caracterizar as seqüências que compõem os quatro *contigs* gerados pelo transcriptoma de *P. brasiliensis* em cultura *in vitro*, que apresentaram similaridades com o gene de isocitrato liase (*icl*) de outros organismos.

2.1 Estratégia Experimental 1

- I. Construir uma biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis* após 6 horas de co-cultivo com células de macrófagos peritoneais murinos.
- II. Seqüenciamento de aproximadamente 500 clones da biblioteca de cDNA.
- III. Análise de similaridades, por meio de ferramentas de bioinformática, das ESTs geradas pelo seqüenciamento da biblioteca de cDNA.

2.2 Estratégia Experimental 2

- I. Construção de oligonucleotídeos representando seqüências internas das quatro *contigs* com similaridades com o gene *icl* de outros microrganismos.
- II. Seqüenciamento dos clones representativos das seqüências que compõem as quatro *contigs* relacionadas ao gene *icl*.
- III. Análise de similaridade, por meio de ferramentas de bioinformática, das ESTs geradas pelo seqüenciamento das quatro *contigs*.
- IV. Análise do número de cópias do provável gene *icl* de *P. brasiliensis*.

3 - MATERIAL

3.1 Meios de Cultura - *Escherichia coli*

Os meios eram autoclavados a 120°C por 20 minutos.

Meio Luria-Bertani (LB)

peptona de caseína	1,0 % (p/v)
extrato de levedura	0,5 % (p/v)
NaCl	1,0 % (p/v)

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH 5M.

Meio LB ágar (LA)

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a 1,5 % (p/v)

Meio 2XYT

peptona de caseína	1,6 % (p/v)
extrato de levedura	1,0 % (p/v)
NaCl	0,5 % (p/v)

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH.

Meio SB

MOPS	0,3 % (p/v)
Triptona	0,9 % (p/v)
Extrato de levedura	0,6 % (p/v)

O pH foi ajustado para 7,0, com NaOH.

Meio SOB

Bacto-triptona	2,0 % (p/v)
Extrato de levedura	0,5 % (p/v)
NaCl	10,0 mM
KCl	2,5 mM

O pH foi ajustado para 7,0.

Meio SOC

Bacto-triptona	2,0 % (p/v)
Extrato de levedura	0,5 % (p/v)
NaCl	10,0 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10,0 mM
MgSO ₄	10,0 mM
Glicose	20,0 mM

3.2 Meios de Cultura – *Paracoccidioides brasiliensis*

Os meios eram autoclavados a 120°C por 20 minutos.

Meio Fava-Neto

Protease peptona	0,3 % (p/v)
Peptona	1,0 % (p/v)
Extrato de carne	0,5 % (p/v)
NaCl	0,5 % (p/v)
Agar	1,6 % (p/v)
Dextrose	4,0 % (p/v)
Extrato de levedura	0,5 % (p/v)

Meio YPD

Extrato de levedura	10,0 % (p/v)
Glicose	2,0 % (p/v)
Bacto-peptona	2,0 % (p/v)

Meio YPD agar

Meio YPD adicionado de ágar bacteriológico a 2,0 % (p/v)

3.3 Antibióticos e soluções utilizadas para seleção de transformantes

Ampicilina

Solução estoque: 50 mg/mL em água destilada estéril.

Estocar protegida da luz, a -20°C.

Concentração final de uso: 100 µg/mL. No caso de células transformadas por eletroporação, a concentração final utilizada é de 200 µg/mL.

Cloranfenicol

Solução estoque: 20 mg/mL em etanol.

Concentração final de uso: 30 µg/mL.

3.4 Linhagens bacterianas

Tabela 2. Linhagens bacterianas utilizadas.

<i>Escherichia coli</i>	
Linhagem	Genótipo
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169(φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>

3.5 Plasmídios utilizados

-pDNR-LIB: pDNR-LIB é um vetor usado para construções de bibliotecas compatíveis com o sistema CLONTECH's Creator[®], incluindo sistema Creator SMART[™] cDNA Libraries. pDNR-LIB é desenvolvido para a construção de bibliotecas de cDNA com insertos que possam ser transferidos para dentro de algum vetor acceptor Creator System. A recombinase Cre, uma recombinase de 38-KDa de bacteriófago P1, media a recombinação entre seqüências de DNA em localizações específicas de vetores doadores e aceptores chamado de sítios *loxP* (Sauer, 1994; Abremski & Hoess, 1984). O vetor pDNR-LIB contém dois sítios *loxP*, os quais flanqueiam as extremidades 5' do sítio múltiplo de clonagem (MCS) e a extremidade 5' da ORF que codifica o gene de resistência a cloranfenicol (Cm^r). O vetor pDNR-LIB também contém o gene para a

enzima sacarase de *B. subtilis* (*SacB*), a qual proporciona seleção negativa contra recombinações incorretas.

3.6 Enzimas de restrição

Tabela 3. Enzimas de restrição utilizadas.

Enzima	Sítio de clivagem	Tampão	Temperatura	Fornecedor
<i>Bam</i> HI	G [^] GATCT	Tampão II	37°C	BioLabs
<i>Bgl</i> II	A [^] GATCT	Tampão III	37°C	BioLabs
<i>Eco</i> RI	G [^] AATTC	Tampão II	37°C	BioLabs
<i>Xba</i> I	T [^] CTAGA	Tampão II	37°C	BioLabs
<i>Xho</i> I	C [^] TCGAG	Tampão II	37°C	BioLabs
<i>Sfi</i>	GGCCNNNN [^] NGGCC	Tampão II	50°C	BioLabs

3.7 Outras enzimas

Taq DNA polimerase – 2U/μL (Cenbiot-RS)

3.8 Tampões de enzimas

Tampão da *Taq* DNA Polimerase 10X

Tris-HCl pH 8,3	0,1 M
KCl	0,5 M
BSA	0,1 % (p/v)
MgCl ₂	15,0 mM

3.9 Soluções de uso generalizado

Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0	10,0 mM
EDTA pH 8,0	1,0 mM

Fenol equilibrado

Fenol	1,0 v
8-hidroxiquinolina (p/v)	0,1 %
β-mercaptoetanol (v/v)	0,2 %

Homogeneizado repetidas vezes com solução de equilíbrio. Estocado protegido da luz e manipulado com luvas. O descarte independente por tratar-se de solvente orgânico (Sambrook & Russel, 2001).

Clorofane

Fenol (equilibrado em pH 7,6)	1,00 v
Clorofórmio	1,00 v
β-hidroxiquinolina	0,05 % (p/v)

Equilibrado com Tris-HCl 100 mM pH 7,6. Estocado protegido da luz e manipulado com luvas. Descarte independente por tratar-se de solvente orgânico (Sambrook & Russel, 2001).

Clorofil

Clorofórmio	24 v
Álcool Isoamílico	1 v

Equilibrado com 0,25 v de tampão TE e estocado protegido da luz.

3.10 Soluções utilizadas nos protocolos de transformação

Estoque de Mg²⁺ 2M

MgCl ₂ .6H ₂ O	20,33 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	24,65 g
H ₂ O (qsp)	100,00 mL

Estoque de glicose 2M

Glicose anidra	26,04 g
H ₂ O (qsp)	100,00 mL

Solução de glicerol 70%

Glicerol	70 mL
H ₂ O (qsp)	30 mL

Esterilizada por autoclavagem a 120°C por 30 minutos.

3.11 Soluções para preparação de DNA plasmidial

Solução I

Glicose 20%	0,92%
EDTA pH 8.0	10,00 mM
Tris-HCl 1M pH 7.4	26,00 mM

Solução II

NaOH	0,2 M
SDS	1,0 % (p/v)

Preparada na hora do uso.

Solução III

Acetato de potássio 5M	60,0 mL
Ácido Acético p.a.	11,5 mL
H ₂ O (qsp)	28,5 mL

O acetato de potássio vai estar numa concentração final de 3 M e o ácido acético a 2 M. Ajustar o pH para 5,5.

RNase A

RNase A	10 mg/mL
---------	----------

Dissolvida em tampão Tris HCl 10mM (pH 7,5), NaCl 15 mM e aquecida a 80°C por 10 minutos. Estocada a -20°C.

3.12 Soluções para eletroforese em géis de agarose

Tampão de Corrida para Gel de Agarose-Tris-borato -TEB (10X)

Trizma base	0,89 M
Ácido bórico	0,89 M
EDTA	0,02 M

O pH é ajustado para 8,0 com ácido bórico.

Tampão de Amostra para DNA/RNA (10X)

Glicerol	50,0 % (v/v)
Azul de bromofenol	0,1 % (p/v)
Xileno cianol	0,1 % (p/v)

Solução de Brometo de Etídio

Brometo de Etídio	10 mg/mL
-------------------	----------

3.13 Soluções para *Southern blot***Solução de Depurinização**

HCl	0,2 M
-----	-------

Solução Desnaturante

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 M

Solução Neutralizante

Tris-HCl, pH 7,4	1,0 M
NaCl	1,5 M

Solução de Transferência

SSC/SSPE	10 X
----------	------

Solução de pré-hibridação/hibridização

Formamida	50,0 % (v/v)
SSPE	5,0 X
Solução Denhardt	5,0 X
SDS	0,5 %

Membrana de Nylon

Hybond N⁺ (Amersham Biosciences)

3.14 Marcadores de massa molecular (MM)

-“**100 bp Ladder**” (Invitrogen Life Technologies, nº de catálogo: 15628-019) - Fragmentos de DNA de 100 a 1500 pb.

-“**1kb bp Ladder Plus**” (Invitrogen Life Technologies, nº de catálogo: 10787-018) - Fragmentos de DNA de 100 a 12000 pb.

-“**λ HindIII**” (Invitrogen Life Technologies, nº de catálogo: 15612-013)
– Fragmentos de 125 a 23000 pb, derivados da digestão do DNA do fago λ com a enzima de restrição *Hind III*.

-“**High Mass**” (Invitrogen Life Technologies, nº de catálogo: 10496-016) - Fragmentos de DNA de 1 a 10kb.

3.15 Oligonucleotídeos dos vetores

-**Universal** (Gibco-BRL[®], nº de catálogo: 18267-014)- 23 nt
5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'

-**Reverso** (Gibco-BRL[®], nº de catálogo: 18424-010)- 23 nt
5'-AGCGGATAACAATTCACACAGG-3'

-**T3** (Invitrogen Life Technologies, nº de catálogo: N565-02)- 20 nt
5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'

-**T7** (Invitrogen Life Technologies, nº de catálogo: N560-02)- 20 nt
5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

3.16 Oligonucleotídeos específicos

Tabela 4. Oligonucleotídeos específicos e sua utilização.

Nome	Seqüência (5'→3')	Utilização
COX1_Fwd	AGTCGACGGTACCGGACATA	Seqüenciamento da porção interna da seqüência
COX1_Rev	AATGGGAGGACTAAGTGGATTT	Seqüenciamento da porção interna da seqüência
ND6_Fwd	TCCTGCTATTTATTCTTAATCGGTCT	Seqüenciamento da porção interna da seqüência
ND6_Rev	CCTACATGAATTAGATTGGATTTATCA	Seqüenciamento da porção interna da seqüência
icl 5'	GCTCACCCAGATGGTCAAAT	Seqüenciamento da porção interna da seqüência
icl 3'	AGTATCCGCATCCGCAATAA	Seqüenciamento da porção interna da seqüência
Ctg2_Fw	TTTTCTCCGAGGCAGTTGTT	Seqüenciamento da porção interna da seqüência
Ctg1_Rv	CTGCTGGCATTTCATATTGAG	Seqüenciamento da porção interna da seqüência
Ctg2_Rv	ATAAGGGCAGTGGTGTGGAG	Seqüenciamento da porção interna da seqüência
Ctg4_Fw	TTGCAGCAGACGTATCCAAG	Seqüenciamento da porção interna da seqüência
Ctg4_Rev	TTCCTTCTCGAATCCCATTG	Seqüenciamento da porção interna da seqüência

3.17 Kits utilizados

“Creator SMART™ cDNA Library Construction”, Clontech

“Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System”, Promega

“Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System”, Promega

“Random Primers DNA Labeling System”, Promega

“DYEnamic™ ET - Dye terminator kit”, GE Healthcare

Os kits foram utilizados de acordo com as instruções dos fabricantes.

4 – MÉTODOS

4.1. Extração de RNA total de *P. brasiliensis* após infecção de macrófagos

O RNA total de *P. brasiliensis*, recuperado após 6h de co-cultivo com macrófagos peritoneais de camundongo foi gentilmente cedido pelos alunos de doutorado do nosso grupo Aldo Tavares e Simoneide Silva (tese em andamento). Resumidamente, o protocolo consistiu na lise dos macrófagos e recuperação dos fungos por centrifugação, conforme estratégia esquematizada na figura 3, sendo o RNA total do fungo extraído pelo emprego do reagente Trizol (Invitrogen).

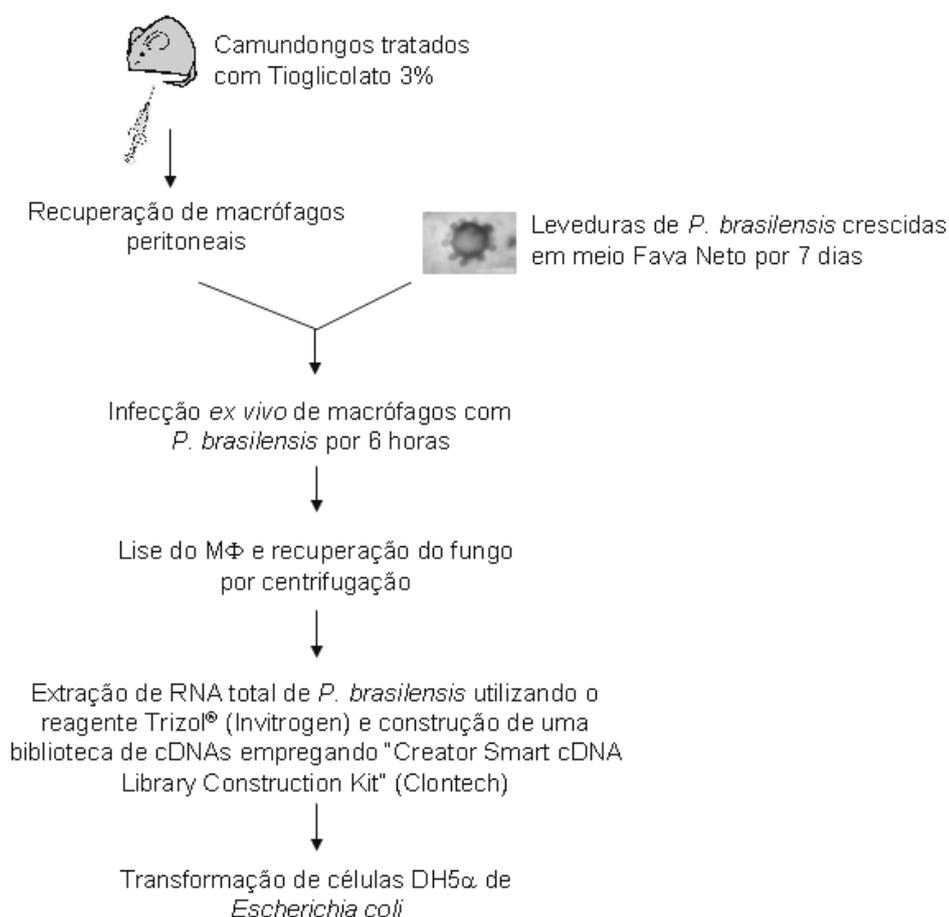


Figura 3. Estratégia experimental de obtenção de RNA total, utilizado na construção da biblioteca de cDNA da forma levedura de *P. brasiliensis* recuperado de macrófagos peritoneais de camundongos após 6 horas de infecção.

Após quantificação, o RNA total foi utilizado na construção da biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis* (Pb), forma de levedura (Y), obtido após 6h de co-cultivo com

macrófagos (MΦ) peritoneais de camundongo, a qual será denominada biblioteca PbY-MΦ.

4.2. Construção da biblioteca de cDNAs de *P. brasiliensis* após infecção de macrófagos

A biblioteca de cDNA PbY-MΦ foi construída pelos alunos de doutorado Aldo Tavares e Simoneide Silva (tese em andamento), utilizando-se o “Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit” (Clontech), segundo protocolo do fabricante. Algumas peculiaridades inovadoras empregadas nesse kit serão brevemente comentadas, visando um melhor entendimento do racional da metodologia. Uma das principais características desse protocolo envolve um mecanismo onde a enzima transcriptase reversa emprega um molde alternativo (um oligonucleotídeo adicionado à reação) após ter sintetizado um cDNA de tamanho completo, contendo em particular a seqüência da extremidade 5’ completa do mRNA, muitas vezes ausente das bibliotecas de cDNA convencionais. O mecanismo acima é denominado **SMART** (Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript) e encontra-se representado na figura 4.

Resumidamente, as principais etapas para a construção da biblioteca são:

1. Síntese da primeira fita de cDNA: Nesta primeira etapa do protocolo, utilizamos 1µg de RNA total de *P. brasiliensis*, obtido conforme descrito no item acima. Três componentes empregados na reação de síntese da primeira fita de cDNA, além do RNA total, são descritos a seguir: **i) iniciador oligo (dT) modificado** – “CDSIII/3’PCR primer”, usado no anelamento ao início da cauda poli(A)⁺ do mRNA, bem como no passo seguinte de amplificação. Este oligonucleotídeo apresenta em sua seqüência o sítio da enzima de restrição *Sfi*IB; **ii) enzima transcriptase reversa (RT)** – A “PowerScript™RT” é uma enzima recombinante, originada da enzima MMLV, sem atividade de RNase H. Essa enzima também apresenta atividade de terminal transferase, adicionando alguns nucleotídeos de desoxicitidina ao cDNA após ter atingido a extremidade 5’ do mRNA; **iii) oligonucleotídeo empregado como molde alternativo para a RT** – “SMART IV Oligo”, que apresenta uma seqüência de oligo(dG) em sua extremidade 3’, anelando-se à curta seqüência de oligo(dC) da extremidade 3’ do cDNA, criando um molde estendido que será copiado na molécula de cDNA pela RT. Este oligonucleotídeo também apresenta em sua seqüência o sítio da

enzima de restrição *Sfi* IA. As etapas 1 a 3 da figura 4 representam o conjunto de reações envolvidas na síntese da primeira fita de cDNA. Assim, esta população de cDNAs será potencialmente enriquecida em moléculas de tamanho completo (cDNAs contendo a extremidade 5' dos respectivos mRNAs).

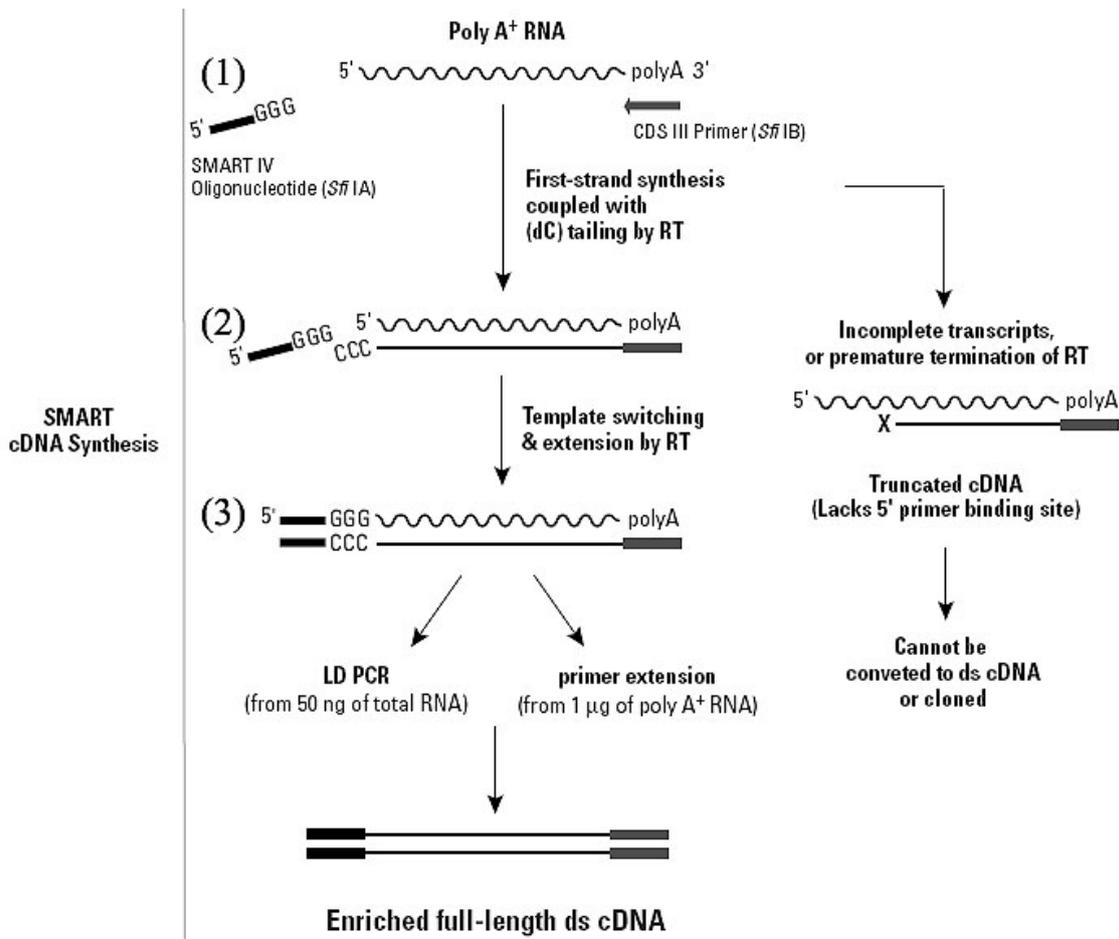


Figura 4: Esquema da construção da biblioteca de cDNA PbY-MΦ (Adaptado de SMARTTM cDNA Library Construction Kit User Manual).

2. Síntese da segunda fita de cDNA: Os cDNAs fita-simples resultantes contêm as extremidades 5' completas, bem como a seqüência complementar ao oligonucleotídeo SMART IV, o qual atua como sítio universal de iniciadores na subsequente etapa de amplificação por *Long-Distance PCR*. Desta forma, apenas aqueles cDNAs fita-simples contendo a seqüência do oligonucleotídeo SMART IV em suas extremidades 5' poderão servir como molde e serem amplificados exponencialmente por PCR. Para esta etapa, foram utilizados 2 µL da reação de síntese da primeira fita de cDNA (1/5 da reação de

transcrição reversa), além dos demais componentes, conforme descrito no protocolo fornecido pelo fabricante. O programa de amplificação utilizado foi:

- 1) Desnaturação: 95°C por 1 minuto.
- 2) Desnaturação: 95°C por 15 segundos.
- 3) Anelamento e extensão: 68°C por 6 minutos.
- 4) Repetição das etapas 2 e 3 por 25 vezes.

3. Clonagem do cDNA fita dupla em vetor pDNR-LIB: Cinco μL do sistema de PCR (1/20 do volume) foram utilizados para quantificação e análises da distribuição de tamanho dos produtos de PCR por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2%. Posteriormente foi realizado fracionamento do cDNA por tamanho em coluna de gel filtração CHROMA SPIN 400 (Clontech). As frações que apresentavam tamanhos acima de 400 pb foram agrupadas em um volume total de 220 μL e precipitadas com acetato de sódio, glicogênio e etanol, conforme protocolo do fabricante. O sedimento resultante foi ressuspendido em 7 μL de H_2O deionizada. O sistema de ligação foi preparado conforme protocolo do fabricante, contendo 2 μL do cDNA fracionado (cerca de 40 ng) e cerca de 100 ng do vetor pDNR-LIB[®] previamente digerido com a enzima *Sfi*I A e B. O vetor pDNR-LIB caracteriza-se por permitir a clonagem direcionada, além de seqüências para pareamento dos iniciadores M13 Universal e Reverso. O sistema de ligação foi incubado a 16°C por aproximadamente 12 horas.

4. Transformação bacteriana: Um μL , correspondendo a 1/5 da reação de ligação foi usado para transformar células eletrocompetentes da linhagem DH5 α de *E. coli*, seguindo protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001). Após incubação das células por 1 hora sob agitação a 250 rpm a 37°C, foi realizado plaqueamento em meio LB sólido contendo cloranfenicol na concentração final de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e glicose na concentração final de 0,5%, visando a obtenção de colônias isoladas, a fim de se avaliar a eficiência da transformação. Posteriormente, com o objetivo de se obter o crescimento confluyente foi realizado a semeadura em placas quadradas de 23 cm e incubadas a 37°C durante a noite. No dia seguinte, 1mL de meio 2XYT contendo cloranfenicol na concentração citada acima foram depositadas sobre a superfície da placa, sendo efetuada raspagem gentil e recuperação do sobrenadante em tubo Falcon de 50mL. A este sobrenadante contendo as células bacterianas foi adicionado glicerol para uma

concentração final de 35%, sendo a mistura exaustivamente homogeneizada, distribuída em alíquotas de 1mL, as quais foram armazenadas em freezer -80°C.

4.3 Semeadura e seqüenciamento de clones de cDNA da biblioteca PbY-MΦ

4.3.1. Minipreparação do DNA plasmidial a partir da biblioteca PbY-MΦ

Uma alíquota das células DH-5α transformadas, armazenadas em glicerol 35% a -80° C, foi submetida a diluições seriadas e posteriormente inoculadas em meio LB-Ágar contendo o antibiótico cloranfenicol na concentração final de 30µg/mL e glicose na concentração final de 0,5%. Após cultivo a 37°C durante a noite (cerca de 14h), colônias isoladas foram selecionadas aleatoriamente e inoculadas em placas *Deep Well* de 96 poços contendo 1mL de meio 2XYT acrescido de cloranfenicol e glicose nas mesmas concentrações descritas acima. Após crescimento por cerca de 22 horas a 37°C, sob agitação, 100µL de cada cultura foram transferidos para as mesmas posições de outra placa contendo o mesmo volume de glicerol 70%. Após homogeneização, essa placa devidamente rotulada, foi estocada a -80°C, correspondendo ao estoque de cada um dos clones da biblioteca que foi seqüenciado.

Os 900µL restantes de cada cultura foram centrifugados a 4000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804R rotor A-2-MTP), equivalente a aproximadamente 2250g, a 20°C por 6 minutos e o sobrenadante descartado. A cada poço foram adicionados 240µL de solução I para a ressuspensão das células em vortex por 2 minutos, sendo o sistema centrifugado novamente nas mesmas especificações descritas acima por 8 minutos. Após descarte do sobrenadante, as placas foram secas em posição invertida sobre papel toalha por 5 minutos, sendo posteriormente adicionados 60µL de solução I. A cada poço o pellet foi ressuspensionado, em vortex por 2 minutos, e a suspensão de células transferida para uma placa *Deep Well* de fundo em “U” já contendo RNase A na concentração final de 400µg/mL, incubada à temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse período de incubação, foram adicionados 60µL de solução II, a placa selada com o auxílio de selo específico e invertida 30 vezes, seguido de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir, a placa foi centrifugada nas mesmas condições descritas acima por 15 minutos. Foram adicionados 60µL de solução III, a placa selada novamente com o auxílio de selo específico e invertida 30 vezes, seguido de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos. O lisado celular de cada poço foi transferido para uma placa

MilliPore, a qual estava previamente presa a uma placa de fundo em “V”, sendo centrifugada nas mesmas condições descritas acima por 5 minutos. Ao filtrado foram adicionados 100µL de isopropanol, sendo a placa selada novamente e centrifugada por 45 minutos, nas condições descritas acima. O sobrenadante foi descartado e, após a adição de 200µL de etanol 70% gelado ao DNA plasmidial sedimentado, a placa foi selada novamente e centrifugada nas condições descritas acima a 4° C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a placa invertida foi centrifugada nas mesmas condições descritas acima por 1 minuto. O sedimento de ácido nucléico for secado por 60 minutos à temperatura ambiente e posteriormente ressuspendido em 20µL de H₂O MilliQ. Os DNAs plasmidiais foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Estes foram então armazenados a – 20°C até o momento de serem submetidos ao seqüenciamento automático.

4.3.2. Amplificação e seqüenciamento dos clones de cDNA

O seqüenciamento foi realizado empregando o kit “DYEnamicTMET - Dye terminator” e o seqüenciador automático “MegaBACE 1000 - GE Healthcare”.

A partir do produto da minipreparação plasmidial foram preparadas reações para seqüenciamento em placas de 96 poços, em um volume final de 5 µL contendo aproximadamente 100-200 ηg de DNA e 5 picomoles do iniciador M13 universal (seqüenciamento da região 5’ do cDNA) ou reverso (seqüenciamento da região 3’ do cDNA). Os demais componentes da reação de seqüenciamento foram adicionados, conforme protocolo padrão fornecido pelos fabricantes, como descrito por Felipe e colaboradores (2003 e 2005).

A amplificação foi realizada de acordo com as seguintes etapas:

- 1) Desnaturação: 94°C por 30 segundos.**
- 2) Anelamento: 50°C por 40 segundos.**
- 3) Extensão e alongamento: 72°C por 1 minuto e 30 segundos.**
- 4) Repetição das etapas 1 a 3 por 4 vezes.**
- 5) Desnaturação: 94°C por 30 segundos**
- 6) Anelamento: 60°C por 40 segundos.**
- 7) Extensão: 72°C por 1 minuto e 30 segundos.**
- 8) Repetição das etapas 5 a 7 por 20 vezes.**
- 9) Extensão final: 72°C por 5 minutos.**

As reações de seqüenciamento foram preparadas em solução aquosa e submetidas diretamente ao seqüenciador automático no Laboratório de Biologia Molecular/UnB, como descrito por Felipe e colaboradores (2003 e 2005).

4.4 Análise computacional das ESTs

As seqüências resultantes do seqüenciamento automático foram analisadas pelo programa PHRED (Ewing *et al.*,1998) para pontuação das bases nucleotídicas. As seqüências correspondentes ao vetor pDNR-LIB foram filtradas pelo programa Cross-Match (Green, 2001). Posteriormente, com o auxílio do programa CAP3 (Huang & Madan, 1999), as seqüências foram comparadas entre si visando o agrupamento das seqüências similares, sendo o consenso resultante denominado de *contigs*. As demais seqüências, que não se alinharam entre si foram denominadas de *singlets*. Os critérios de qualidade na seleção das seqüências analisadas neste trabalho foram: PHRED ≥ 20 e tamanho da seqüência ≥ 100 nts. O conjunto de seqüências representadas pelas *contigs* e *singlets* foi definido como Grupos desse transcriptoma a serem posteriormente analisados pelo servidor Máster Server (processador 4 Pentium III Xeon® 700 MHz, 2 MB de memória cache, 2 GB de memória RAM, 2 discos rígidos de 73 GB SCSI e 2 discos rígidos de 18 GB SCSI). Esta máquina está lotada em nosso Laboratório de Bioinformática.

4.5 Caracterização dos genes *Pbic11* e *Pbic12*

4.5.1 Análise do número de cópias dos genes por *Southern blot*

Para análise do número de cópias do gene *icl*, foi realizado o experimento de *Southern blot* genômico. As condições de eletroforese em gel de agarose e transferência para membrana de nylon (Hybond N⁺ - Amersham Biosciences) seguiram o protocolo padrão (Sambrook & Russel, 2001).

Foram utilizados nesse experimento cerca de 15 µg de DNA genômico de *P. brasiliensis* digerido com diferentes enzimas de restrição, sendo empregado como sondas os fragmentos de DNA correspondentes aos genes *icl1* e *icl2*. Vale ressaltar, que nas seqüências de nucleotídeos dos fragmentos de cDNA usados como sondas, os sítios de clivagem para as enzimas empregadas na digestão do DNA genômico estão ausentes. De forma resumida os procedimentos para o experimento de *Southern blot* são:

1. Síntese da sonda: As sondas utilizadas nos experimentos de *Southern blot* consistiam do produto de PCR purificado correspondente aos genes *Pbicl1* e *Pbicl2*. Cerca de 25 ng desses fragmentos de cDNA foram marcados pela técnica de “random priming” com (α - 32 P) dATP utilizando-se o kit Megaprime (Amersham Biosciense), de acordo com o protocolo descrito pelos fabricantes. A sonda foi purificada por meio de colunas MicroSpin S300 (Amersham Bioscienses) seguindo instruções do fabricante, sendo a radioatividade incorporada quantificada pelo “Liquid Scintillator Analyzer” 1600 (Packard Canberra Company). Após desnaturação, a sonda foi utilizada na hibridização da membrana preparada anteriormente.

2. Hibridização e lavagem: A membrana foi submetida à pré-hibridização por 2 horas a 42°C em solução de hibridização (50% formamida; SSPE 4X; Solução de Denhardt 5X; 0,5% SDS acrescido de 100 µg/ mL de DNA de esperma de arenque desnaturado). Após essa etapa, as membranas foram hibridizadas durante a noite com a sonda, nas mesmas condições descritas na pré-hibridização. Seguiram-se à hibridização sucessivas lavagens da membrana até uma estringência final de 0,1X SSPE, SDS 0,1% a 65°C por 20 minutos. A membrana foi exposta a filme de raios X a -80°C ou ao aparelho Typhoon 9210-Variable Mode Imager (Molecular Dynamics Amersham Pharmacia Biotech), por um período de tempo adequado.

4.5.2 Seqüência dos genes *icl1* e *icl2*

O seqüenciamento foi realizado empregando o kit “DYEnamicTMET - Dye terminator” e o seqüenciador automático “MegaBACE 1000 - GE Healthcare”.

O procedimento de seqüenciamento dos clones referentes as PbAESTs PbAESTs PBDEX-Y1-106t_D10, PBDEX-Y1-104t_A06, PBDEX-M1-028t_G11 e PBDEX-M1-040t_C02, que compõem as *contigs* 1, 2 3, e 4 respectivamente (tabela 7), seguiram o protocolo descrito no item 4.3.2.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO —————

5.1 Construção de uma biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis* após infecção de macrófagos

A construção de bancos de dados de seqüências a partir de uma biblioteca de cDNA, representando os transcritos presentes em uma dada condição biológica de um organismo, tem recebido grande atenção nos últimos anos. Diversos projetos de seqüenciamento de bibliotecas de cDNAs de uma variedade de tecidos humanos (Adams *et al.*, 1991), tecidos de camundongos (Hoog, 1991), *Caenorhabditis elegans* (McCombie *et al.*, 1992) e fungos como *Magnaporthe grisea* (Lu *et al.*, 2005), *Gibberella zeae* (Trail *et al.*, 2003), *Blastocladiella emersoni* (Ribichich *et al.*, 2005), *A. nidulans* (Sims *et al.*, 2004), *N. crassa* (Zhu *et al.*, 2001) e *P. brasiliensis* (Felipe *et al.*, 2003 e 2005; Goldman *et al.*, 2003), têm sido desenvolvidos graças à rapidez de geração de dados de seqüências. Além de gerar informações a respeito da identificação de genes, as seqüências obtidas de uma seleção randômica de cDNAs pode descrever os níveis e a complexidade de expressão de genes de uma determinada amostra em condições diversas como mudança de temperatura, estresse nutricional ou oxidativo e no contato com células de hospedeiros, no caso de patógenos (Okubo *et al.*, 1992). Muitos bancos de dados estão abastecidos por seqüências representando porções 5' e/ou 3' de cDNAs, as quais foram chamadas de *Expressed Sequence Tags* (EST).

A estratégia de geração de ESTs a partir de bibliotecas de cDNAs refletindo uma determinada condição biológica está bem estabelecida em nosso laboratório e tem-se mostrado viável e eficiente. No contexto desse trabalho de mestrado, foi construída uma biblioteca de cDNA da forma levedura de *P. brasiliensis* recuperado após 6h de co-cultivo com macrófago peritoneal de camundongo em cultura. O RNA total do fungo empregado na construção dessa biblioteca foi gentilmente cedido pelos alunos de doutorado de nosso grupo, Aldo Tavares e Simoneide Silva (tese em andamento), tendo sido obtido diretamente após infecção de macrófagos, e sem qualquer etapa de cultivo *in vitro* do fungo. Após lise dos macrófagos e coleta dos fungos por centrifugação (Figura 3), a extração do RNA total foi realizada pelo uso do reagente Trizol (Invitrogen), conforme descrito na metodologia. Uma vez que a quantidade de RNA obtida por essa estratégia é muito limitante, foi empregado o protocolo de construção de bibliotecas de cDNA por PCR, utilizando o “CreatorTM SMARTTM cDNA Library Construction Kit”

(Clontech). De acordo com o fabricante, quantidades mínimas, de até 50ng de RNA total ou 25ng de RNA poli(A)⁺, podem ser empregadas com sucesso na construção de bibliotecas por meio dessa metodologia. Após amplificação, a população de cDNA é clonada no vetor pDNR-LIB, o qual possui flanqueando o sítio múltiplo de clonagem, seqüências para os iniciadores M13 Universal e Reverso, que permitem a amplificação e seqüenciamento dos insertos de cDNA, a partir de suas extremidades 5' e/ou 3'. A biblioteca foi denominada biblioteca PbY-MΦ.

A partir de uma alíquota da biblioteca PbY-MΦ armazenada a -80°C, o seqüenciamento foi realizado empregando DNA plasmidial de clones isolados e selecionados aleatoriamente. Para tanto, clones da biblioteca foram cultivados em placas de 96 poços, sendo que cada placa submetida à minipreparação de DNA plasmidial apresentava uma réplica contendo, nas mesmas posições, uma alíquota dos mesmos clones bacterianos em glicerol 35%, a qual após ser rotulada apropriadamente era estocada em freezer a -80°C.

A figura 5 exemplifica o padrão típico de uma preparação de DNA plasmidial, a ser submetida ao seqüenciamento automático, visando a geração de um banco de ESTs referente à biblioteca PbY-MΦ.

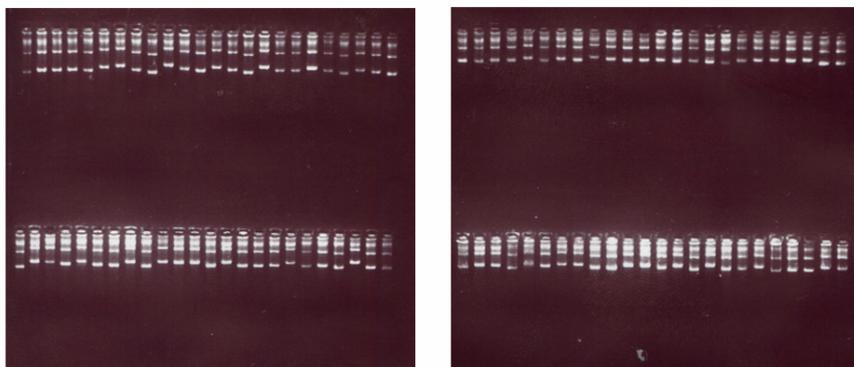


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, na concentração final de 0,5 µg/mL, ilustrando o perfil característico de DNAs plasmidiais preparados a partir de clones isolados e selecionados aleatoriamente da biblioteca de cDNA PbY-MΦ.

5.2 Geração e análise computacional de ESTs

Para a geração de ESTs, as amostras selecionadas foram enviadas para seqüenciamento automático utilizando iniciadores M13 Universal ou Reverso. As ESTs geradas foram analisadas automaticamente pelo programa PHRED para pontuação baseada na qualidade das bases nucleotídicas, sendo selecionadas somente as ESTs que

apresentaram os seguintes critérios: extensão nucleotídica ≥ 100 bases e PHRED ≥ 20 (onde a probabilidade de erros em cada nucleotídeo é de 1/100). Em seguida, as seqüências correspondentes ao vetor pDNR-LIB que poderiam estar incluídas nas ESTs foram filtradas pelo programa Cross Match (Fig. 6).

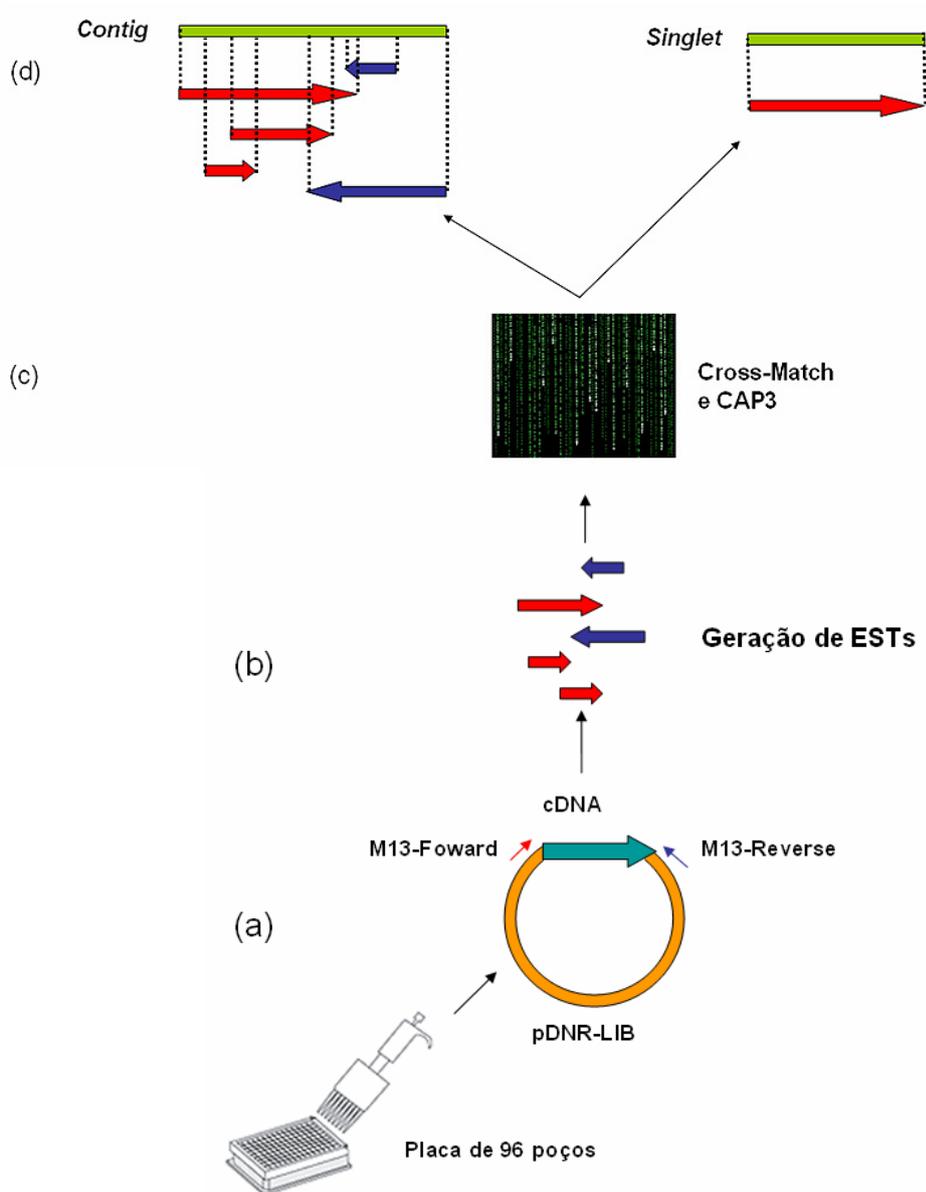


Figura 6: Estratégia de geração e agrupamento de ESTs. (a) O inserto de cDNA, representando um transcrito é clonado no vetor pDNR-LIB, contendo seqüências para amplificação e seqüenciamento (M13 Universal e Reverso); (b) amplificação do inserto, resultando em uma EST que representa as regiões 5' ou 3' do inserto; (c) análise computacional usando os programas Cross-Match para de filtragem do vetor, e CAP3 para agrupamento das seqüências similares; (d) resultado final das análises onde as seqüências similares são agrupadas em *contigs* enquanto aquelas que não apresentaram similares permanecem como seqüências únicas ou *singlets*.

5.3 Agrupamento das ESTs

Uma vez que as ESTs correspondem a pequenas regiões de genes, entre 200 e 500 nucleotídeos, estas podem dificultar posteriores análises de alinhamento por similaridade. Um dos mecanismos para minimizar esta limitação, se dá pelo agrupamento de pequenas ESTs em uma seqüência consenso maior, obtida pelo uso de programas de alinhamento como o “TIGR Assembler” (Kirkness & Kerlavage, 1997), PHRAP (Ewing *et al.*, 1998) e CAP3 (Huang & Madan, 1999). O mais utilizado destes, CAP3 utilizado neste trabalho, emprega um método de alinhamento de múltiplas seqüências, gerando uma seqüência consenso, chamada *contig*, enquanto as seqüências que não apresentaram similares permaneceram como ESTs, chamadas de *singlets* (Fig. 6).

Após a eliminação de nucleotídeos de baixa qualidade; das seqüências correspondentes a vetores e DNA bacteriano; e da categorização de seqüências baseada nos critérios de PHRED ≥ 20 e tamanho ≥ 100 nt, 474 ESTs foram selecionadas, representando 90% do total seqüenciado. O programa CAP3 agrupou 375 seqüências em 16 *contigs*, com um tamanho médio de cerca de 640 pb, enquanto 99 ESTs permaneceram como *singlets*, conforme esquematizado na figura 7.

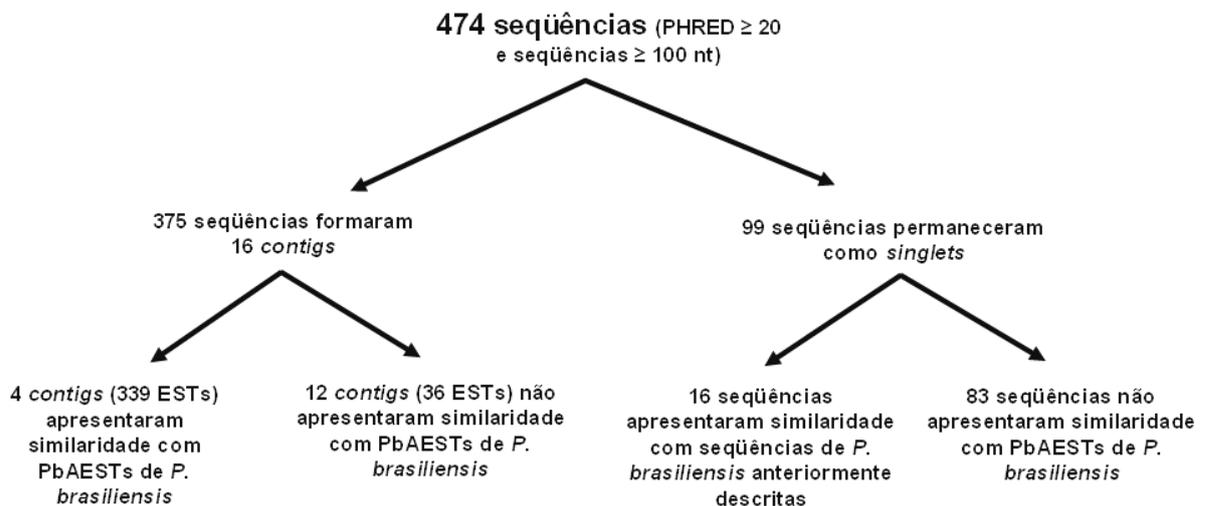


Figura 7: Esquema mostrando o agrupamento das 474 seqüências da biblioteca PbY-MΦ e análise de similaridade com o banco de dados referente ao transcriptoma de *P. brasiliensis* na forma de micélio e levedura (PbAEST) cultivadas *in vitro* (Felipe *et al.*, 2003 e 2005).

Conforme mostrado na figura 8, a distribuição das 375 ESTs que formaram as 16 *contigs* apresentou o seguinte perfil: a *contig5* continha o maior número de ESTs, com

256 seqüências agrupadas em um consenso de 2049 pb; a *contig11* apresentou 68 seqüências, enquanto a *contig10* era constituída por 12 seqüências; a maioria das *contigs* restantes eram compostas por 2 a 5 seqüências. Quinze ESTs, distribuídas entre a *contig4* e 13 *singlets*, mostraram índice de similaridade com seqüências de células de mamíferos. Esta contaminação provavelmente ocorreu no momento da recuperação do RNA total do fungo *P. brasiliensis*, quando uma pequena quantidade de RNA de macrófago peritoneal de camundongo foi incorporada ao RNA total do fungo. Estas seqüências foram tratadas como contaminantes sendo então descartadas. Após a remoção das ESTs que apresentaram similaridades com seqüências de células de mamíferos, 459 ESTs compunham o total a ser analisado (“ESTs database”).

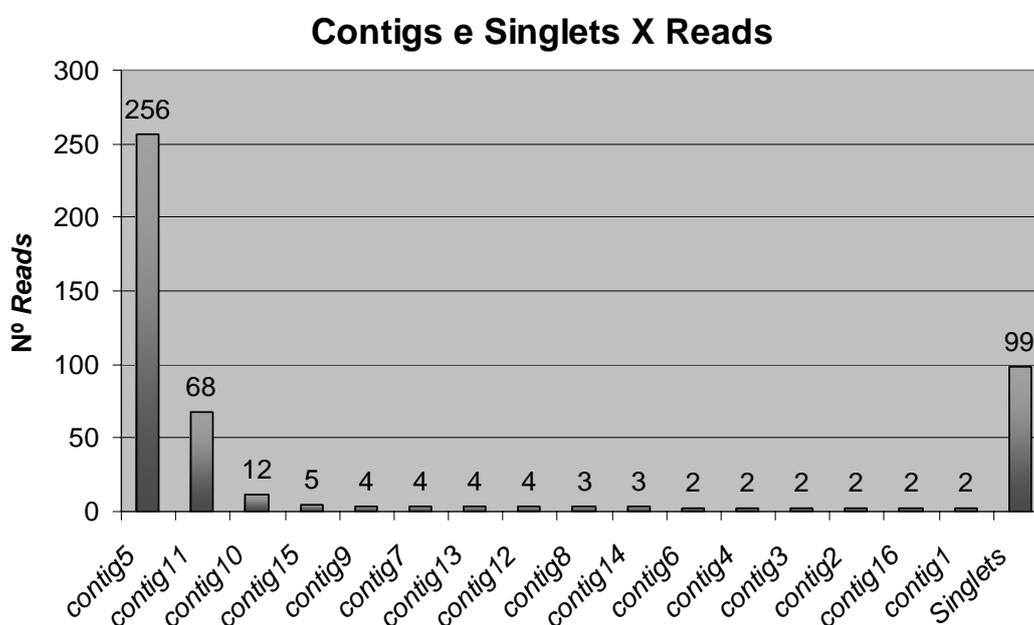


Figura 8: Distribuição do número de seqüências de cada *contig* e o número de seqüências que permaneceram como *singlets*, após a análise pelo programa CAP3, a coluna de *Singlets* representa o número de seqüências que permaneceram com cópias únicas.

5.4 Análise de similaridades das seqüências geradas (*contigs* e *singlets*) em bancos de dados

Dados acumulados em banco de dados como GeneBank, EMBL (European Molecular Biology Laboratory Nucleotide Sequence Database), DDBJ (DNA Data Bank Japan), PIR (Protein Information Resource) e SWISS-PROT, associados aos métodos computacionais permitiram não apenas apresentar um conjunto de genes e suas localizações nos genomas, mas também estabelecer relações filogenéticas entre

diferentes organismos, bem como predições de estruturas moleculares (revisado por Kanehisa & Bork, 2003). Programas de busca por similaridades, como o Blast (Altschul *et al.*, 1990), integraram as vantagens de respostas mais rápidas, tentativas de pareamento a partir de pequenas seqüências, valores estatísticos de alinhamento (e-value), além da possibilidade do uso da interpretação humana ao comparar duas seqüências (McGinnis & Madden, 2004). Para a análise das ESTs da biblioteca PbY-MΦ foi utilizada a ferramenta Blast, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Inicialmente, serão descritos os dados das análises de similaridade das seqüências obtidas neste trabalho (PbY-MΦ), comparadas com o transcriptoma das formas de micélio e levedura de *P. brasiliensis* cultivados *in vitro* (PbYM), conforme descrito por nosso grupo (Felipe *et al.*, 2003 e 2005). Para as seqüências descritas no transcriptoma PbYM, será usada a nomenclatura PbAEST seguida pelo número do grupo, conforme adotado nas publicações de Felipe e colaboradores (2003 e 2005). Tendo em vista o grande número de seqüências depositadas quase que diariamente nos bancos de dados, também foram realizadas buscas de similaridade nos bancos de dados Genbank nr e dbEST, disponíveis na página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. A significância de alinhamento entre as seqüências relacionadas foi determinada pelo valor de E (e-value), que categoriza o índice de confiabilidade dos dados analisados em uma combinação de seqüências (McGinnis & Madden, 2004). Desta forma, o critério adotado foi um valor de E de alta para significância $E < 10^{-20}$, média significância $10^{-20} \leq E \leq 10^{-8}$, baixa significância $10^{-8} \leq E \leq 1$, e insignificante $E \geq 1$. Além do valor de E, também foi levada em consideração a porcentagem de cobertura, indicando a extensão da sobreposição da seqüência analisada com as similares de outros organismos depositadas nos bancos de dados. Esta condição adicional foi empregada porque uma seqüência analisada poderia apresentar um valor de E de alta significância, porém apenas sobre uma pequena extensão da seqüência exibindo similaridade.

Dos 101 grupos constituídos pelas 15 *contigs* e 86 *singlets*, 4 *contigs* e 16 *singlets* apresentaram similaridades com seqüências de *P. brasiliensis* já anteriormente descritas no transcriptoma referente às formas de micélio e levedura cultivadas *in vitro* (Fig. 7).

Passaremos a descrever a análise das principais ESTs da biblioteca PbY-MΦ que apresentaram similaridade com seqüências de PbMY, conforme apresentado na tabela 5.

A *contig5* de PbY-MΦ, formada por 256 ESTs, apresentou similaridade com a PbAEST2031, com um valor de E de alta significância (0.0) e porcentagem de cobertura de 85,7%. Enquanto a *contig11* apresentou similaridade com a PbAEST1, com um valor de E de alta significância (0.0) e uma porcentagem de cobertura de 96,7%.

As PbAEST2031 e PbAEST1 foram anotadas como seqüências sem similares em banco de dados (NID). Porém, análises posteriores das *contig5* e *contig11* com o banco nr, utilizando a ferramenta Blastn, revelaram similaridades com os genes mitocondriais para rRNA da subunidade ribossomal maior de *Epidermophyton floccosum* (e-value 2e-98) e rRNA da subunidade ribossomal menor de *Ajellomyces dermatitidis* (e-value 1e-96), respectivamente. Estes genes não foram anotados no momento da descrição do banco de PbAESTs de *P. brasiliensis* devido ao fato da ferramenta Blastx ter sido a escolhida para as análises de similaridade e anotação.

Dados na literatura relatam que quando células hospedeiras são infectadas por *C. neoformans* ocorre uma diminuição geral nos níveis de expressão de genes da maquinaria traducional do patógeno codificada no genoma nuclear, tais como genes envolvidos na transcrição e maturação de rRNAs, associação e manutenção de ribossomos e fatores de iniciação e alongação (Fan *et al.*, 2005). Contudo, na biblioteca de PbY-MΦ, o grande número de ESTs com similaridade com genes da maquinaria ribossomal mitocondrial pode refletir a importância do papel da mitocôndria nesta situação de infecção do fungo *P. brasiliensis* em células hospedeiras de mamíferos. Análises por *microarray* das respostas transcricionais de *C. albicans* após internalização por células de macrófagos de camundongos realizadas por Lorenz e colaboradores (2004), mostraram uma manutenção ou aumento dos níveis transcricionais dos genes da maquinaria traducional mitocondrial, com a concomitante redução dos níveis da expressão dos genes nucleares da maquinaria traducional.

Tabela 5: Resultado das análises de similaridade, utilizando a ferramenta Blastn, dos principais grupos de seqüências da biblioteca PbY-MΦ (geradas neste trabalho), comparadas às PbAESTs do transcriptoma das formas de M e Y de *P. brasiliensis* cultivadas *in vitro* (Felipe *et al.*, 2003 e 2005).

Seqüências do transcriptoma PbY-MΦ ^(a)	PbAESTs do transcriptoma PbMY (Felipe <i>et al.</i> , 2003, 2005) ^(b)	e-value	Porcentagem de cobertura ^(c)
Grupo1: <i>contig5</i> (256 ESTs; 2051 nt)	PbAEST2031 (4 seqs. M e 4 seqs. Y; 971 nt) - seqüência sem similares em banco de dados	0.0	85,7%
Grupo2: <i>contig11</i> (68 ESTs; 1351 nt)	PbAEST1 (4 seqs. Y; 1126 nt) - seqüência sem similares em banco de dados	0.0	96,3%
Grupo3: <i>contig10</i> (12 ESTs; 480 nt), <i>contig14</i> (3 ESTs; 884 nt)	PbAEST2475 (2 seqs. M e 2 seqs. Y; 640 nt) - ATP sintase de <i>Neurospora crassa</i>	e-140 e 3e-34	52,7% e 12,2%
Grupo4 (DW02E09; 381 nt)	PbAEST2023 (2 seqs. M e 14 seqs. Y; 861 nt) - Inibidor natural de F ₁ F ₀ ATPase mitocondrial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	e-101	59,3%
Grupo5 (DW25F04; 383 nt)	PbAEST2205 (5 seqs. M e 45 seqs. Y; 1389 nt) - Proteína transportadora de alta afinidade de cobre <i>ctr4</i> de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0.0	85,9%
Grupo6 (DW02F10; 494 nt)	PbAEST521 (4 seqs. M e 21 seqs. Y; 1881 nt) - Glutamina sintetase de <i>Aspergillus nidulans</i>	0.0	84%
Grupo7 (DW25H06; 313 nt)	PbAEST4 (4 seqs. M e 8 seqs. Y; 988 nt) - Proteína L6 ribossomal 60S de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	e-100	69,6%
Grupo10 (DW26A06; 445 nt)	PbAEST2266 (2 seqs. M; 868 nt) – Proteína de transferência fosfatidilglicerol /fosfatidilinositol de <i>Aspergillus oryzae</i>	e-119	48,8%
Grupo11 (DW02C05; 564 nt)	PbAEST1545 (2 seqs. Y; 896 nt) – Proteína Grr1 necessária para repressão por glicose de <i>Neurospora crassa</i>	7e-93	38,3%
Grupo 12: (EST04959, EST12639, EST02737, EST10314, EST12433, EST04504, EST13339, EST12558, EST11160, EST09474) ^(d)	Seqüências de <i>P. brasiliensis</i> depositada no banco dbEST (Goldman <i>et al.</i> , 2003)		

(a) Para cada grupo de seqüências encontra-se indicado o nome da *contig* ou do *singlet*, o número de ESTs agrupadas quando esta for uma *contig*, e o tamanho da seqüência em nucleotídeos (nt).

(b) Resultado do Blastn mostrando a PbAEST do transcriptoma PbMY que gerou o melhor índice de similaridade. Também foi indicado o número de ESTs agrupadas, o tamanho da seqüência (nt) e a anotação da PbAEST.

(c) O cálculo da porcentagem de cobertura foi realizado da seguinte forma: a extensão (nt) da identidade entre uma dada seqüência da biblioteca PbY-MΦ com relação à respectiva PbAEST do transcriptoma PbMY dividido pelo tamanho, em nucleotídeos, da menor seqüência da comparação.

(d) As seqüências do transcriptoma PbY-MΦ listadas como grupo 12 apresentaram similares com seqüências depositadas por Goldman e colaboradores (2003) no banco de dados dbEST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

A análise do transcriptoma das formas de micélio e levedura de *P. brasiliensis* cultivado *in vitro* (Felipe *et al.*, 2003 e 2005) revelou 492 PbAESTs referentes a genes nucleares de rRNAs e apenas 12 PbAESTs para os respectivos rRNAs mitocondriais, correspondendo a 2% do total seqüenciado (25,598 ESTs). Em contraste, na biblioteca PbY-MΦ foram descritas 324 ESTs de rRNAs, as quais representam 68% do total seqüenciado, sendo todas correspondentes a rRNA mitocondriais. Embora relatos na literatura sugiram um papel relevante da mitocôndria na condição de infecção de células fagocíticas de mamíferos por fungos, no qual se insere o nosso modelo *P. brasiliensis*/macrófago murino, a diferença nos níveis transcricionais quando comparado com o banco PbYM cultivado *in vitro*, poderia também refletir as estratégias adotadas na construções de ambos os bancos de cDNA, PbY-MΦ e PbYM.

A estratégia utilizada na construção do banco PbYM consistiu na recuperação do RNA total do fungo cultivado nas diferentes condições *in vitro*, posterior isolamento dos mRNAs por fracionamento em colunas de Oligo(dT) e construção da biblioteca de cDNA de PbYM por metodologia convencional, empregando como molde, na síntese do cDNA, a fração de RNA enriquecida por mRNAs Poli(A)⁺. No nosso modelo de infecção de *P. brasiliensis* em macrófagos murinos por *P. brasiliensis*, para a construção da biblioteca de cDNA PbY-MΦ, o RNA total do fungo foi usado diretamente na síntese da primeira fita de cDNA a qual em seguida foi amplificada pelo uso de iniciadores, conforme metodologia recomendada pelos fabricantes do “Creator SMARTTM cDNA Library Construction Kit”. Contudo, vale ressaltar que a comparação entre os conteúdos de adenosinas dos rRNAs mitocondriais e nucleares de *P. brasiliensis* é muito diferente, sendo cerca de 40% em mitocondriais e apenas 25% nos nucleares. Esse elevado conteúdo de adenosinas, provavelmente poderia ser substrato para anelamento dos iniciadores oligo(dT) e conseqüentemente amplificação do transcrito. Desta forma, em adição à importância da mitocôndria na condição de infecção empregada neste deste trabalho, um excesso na representação de adenosinas nos rRNAs mitocondriais no banco de cDNA PbY-MΦ poderia também ser decorrente da metodologia empregada na construção da biblioteca de cDNA. Neste sentido experimentos adicionais são necessários para validar essa distribuição quantitativa dos níveis de expressão entre os genes de rRNA mitocondrial e nuclear. Por exemplo, experimentos de RT-PCR semi-quantitativa e/ou *real time* PCR, empregando oligonucleotídeos dirigidos para cada um desse genes, poderiam permitir uma melhor

avaliação do perfil transcricional relativo à expressão dos genes da maquinaria traducional de *P. brasiliensis* tanto na condição de infecção quanto do cultivo *in vitro*.

Outro grupo descrito neste trabalho formado pelas *contig10* e *contig14* do transcriptoma PbY-MΦ, teve similaridade com a PbAEST2475, a qual está anotada como ATP sintase de *Neurospora crassa* (Tabela 5). Análises das seqüências das *contig10* e *contig14* com o banco nr, confirmaram similaridade com o gene mitocondrial da subunidade 9 da ATP sintase de *Lecanicillium muscarium* e *Aspergillus tubingensis* respectivamente.

O *singlet* DW02E09 de PbY-MΦ apresentou similaridade com a PbAEST2023, anotada como inibidor natural de F₁F₀ ATPase mitocondrial de *S. cerevisiae*, com um valor de E de alta significância (e-101).

A enzima ATP sintase, conhecida também como complexo F₁F₀-ATP sintase, presente na membrana plasmática de bactérias, na membrana tilacóide de cloroplastos e membrana interna mitocondrial de células eucarióticas, catalisa a formação de ATP a partir de ADP e Pi, como pode ser observado na figura 9, representada pelo complexo V.

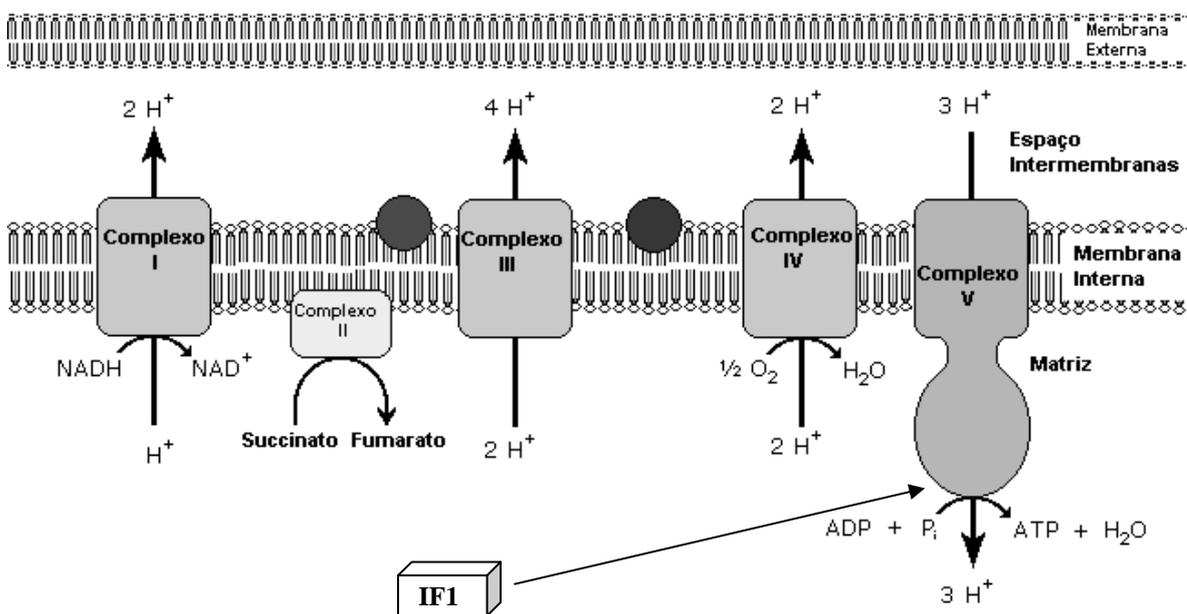


Figura 9: Esquema da cadeia respiratória responsável pela geração de gradientes de prótons no espaço intermembranoso da mitocôndria, representado pelos complexos I a IV. O gradiente é utilizado posteriormente como força motora pela ATP sintase, complexo V, para a síntese de ATP a partir de ADP e Pi (www.fundamentosdebioquimica.hpg.ig.com.br).

A ATP sintase é formada por um complexo multi-subunidades codificadas por genes nucleares e mitocondriais, e está organizada em duas unidades funcionais, F_1 e F_0 ligadas por uma haste (“stalk”). A unidade funcional F_1 , composta por 6 subunidades, sofre alterações conformacionais em sua estrutura, permitindo a entrada de ADP e P_i e sua conversão em ATP por meio de seu movimento rotatório produzido pelo bombeamento de prótons H^+ mediado pela porção F_0 . A unidade funcional F_0 é composta por pelo menos nove subunidades codificadas por genes nucleares e mitocondriais responsáveis pela ligação e estabilidade do complexo ATP sintase à membrana interna da mitocôndria (Devenish *et al.*, 2000). Em *S. cerevisiae*, três subunidades, a subunidade 6 da ATP sintase (ATP6), ATP8 e ATP9 são codificadas por genes mitocondriais (Arnold *et al.*, 1998). O decréscimo da concentração de H^+ , como resultado da privação de oxigênio na célula, pode causar a ação reversa da ATP sintase, resultando na hidrólise de ATP em ADP e P_i . Esta atividade é regulada diretamente pela proteína inibidora natural de ATP sintase, chamada de IF1, codificada pelo gene *Inh1* em leveduras (Deinhart, *et al.*, 2002). Sob condições de baixas concentrações de H^+ as IF1 formam homodímeros, que se ligam diretamente à unidade funcional F_1 , impedindo a atividade reversa da ATP sintase, preservando assim os níveis de ATP celular (Cabezón *et al.*, 2001). Uma maior representação do número de ESTs com similaridade com o gene ATP9 no transcriptoma PbY-MΦ (15 ESTs) em relação ao transcriptoma PbYM (com apenas 2 ESTs na forma de levedura), a detecção do provável ortólogo do gene IF1 representado por uma EST, podem sugerir a necessidade da manutenção dos níveis de ATP na célula de *P. brasiliensis* na condição de infecção de macrófagos murinos.

O *singlet* DW25F04 de PbY-MΦ apresentou similaridade com a PbAEST2205 de PbYM, anotada como uma proteína transportadora com alta afinidade por cobre, codificada pelo gene *ctr4* de *S. pombe*. Em leveduras *S. cerevisiae*, o transportador de cobre, localizado na membrana plasmática, pertence à família de proteínas transportadoras de cobre (CTR), que é muito conservada desde leveduras a humanos, com todas possuindo três domínios transmembrânicos com motivos MX_3M , necessários para sua função carreadora do íon metálico (Puig *et al.*, 2002). Os níveis transcricionais dos genes que codificam os transportadores de cobre estão sob controle dos níveis ambientais de cobre e da presença intracelular de Cuf1p, um fator transcricional sensível à presença de cobre (Labbé *et al.*, 1999). O cobre é um íon metálico essencial para todos os organismos vivos e atua como importante cofator em muitos processos,

como na homeostase de níveis intracelulares de ferro, produção de energia e proteção contra estresse oxidativo, atuando junto a proteínas envolvidas nas respostas a estresse oxidativo, como a citocromo c oxidase, a zinco superóxido dismutase, a lisil oxidase entre, outras (Zhou & Thiele, 2001).

A importância da manutenção dos níveis de íons cobre em fungos patogênicos em condições de infecção pode ser evidenciada pelo aumento dos níveis transcricionais de genes da família de proteínas transportadoras de cobre, CTR e a proteína responsiva a cobre (CRP). A análise do perfil transcricional de *H. capsulatum* na forma de levedura ou após indução de estresse que gera espécies reativas de nitrogênio (NO), mostra um aumento dos níveis de expressão de genes da família CRP (Nittler *et al.*, 2005). Embora não se saiba a exata constituição bioquímica do fagossomo de células fagocíticas, certamente este não é um meio rico, provavelmente apresentando um baixo teor desses íons metálicos. Em *C. albicans* a resposta transcricional após internalização por células de macrófagos, revela um aumento da expressão de genes relacionados à homeostase de íons metálicos, incluindo o gene transportador de cobre *ctr1* (Lorenz *et al.*, 2004). Na condição de infecção de *P. brasiliensis*, o qual se encontra em um ambiente nutricionalmente pobre e de estresse oxidativo no interior do fagossomo, a detecção de ESTs com similaridade com o gene *ctr4*, mesmo em um número reduzido de ESTs do transcriptoma PbY-MΦ tendo sido geradas até o momento, poderia indicar a importância da expressão deste gene, conforme mencionado acima para outros modelos.

O *singlet* DW02F10 de PbY-MΦ, apresentou similaridade com a PbAEST521 de PbYM, com um valor de E de alta significância (0.0), e porcentagem de cobertura de 84%. A PbAEST521 está anotada como o gene glutamina sintetase (*gln*) de *A. nidulans*, sendo altamente expressa na forma de levedura de *P. brasiliensis* cultivada *in vitro*. Foram descritas quatro ESTs para a forma de micélio e 21 para a forma de levedura, em um total de 19,718 ESTs descritas no transcriptoma PbYM (Felipe *et al.*, 2005). A enzima glutamina sintetase (GS), codificada pelo gene *gln*, é responsável pela síntese da glutamina a partir de glutamato, amônia e ATP. A glutamina é um aminoácido utilizado em diversas reações centrais do metabolismo celular; como precursor na síntese de outros aminoácidos, como a prolina e arginina, de purinas e pirimidinas, além de ter um importante papel no transporte de NH_4^+ entre órgãos de eucariotos multicelulares. Em microrganismos, a GS juntamente com a glutamato sintetase é responsável pela assimilação de amônia sob condições de crescimento com limitações de nitrogênio. Suas atividades e expressão estão sob controle transcricional e pós-transcricional, bem

como inibição por respostas de vários produtos do metabolismo da glutamina (revisto por Fisher, 1999).

Em *S. cerevisiae*, 80% do nitrogênio celular provém do glutamato, enquanto os 20% restantes provém da glutamina. Porém, a diminuição dos níveis de α -cetogluturato durante o crescimento com restrições de glicose favorece a troca da atividade da enzima glutamato desidrogenase pelo aumento, em pelo menos três vezes na afinidade da GS pelo α -cetogluturato (revisto por Magasanik, 2003). Estudos sobre a biossíntese e organização da parede celular de *S. cerevisiae*, revelam que mutantes do gene *gln1* apresentaram formas irregulares e fragilidade na parede celular, indicando que a escassez de glutamina afeta a integridade da parede celular do fungo (Shimizu *et al.*, 1997).

Em *M. tuberculosis*, uma bactéria patogênica com características infecciosas similares aos fungos patogênicos, não há a presença de glutamato sintetase, de forma que a glutamina sintetase é a única enzima responsável pela assimilação de nitrogênio. Tullius e colaboradores (2003) analisaram mutantes *gln1* em *M. tuberculosis* e verificaram a dependência da glutamina no meio de cultura para crescimento normal da bactéria, e em ensaios de infecções com macrófagos de mamíferos em cultura, mesmo na presença de altas taxas da glutamina no meio, a bactéria teve seu crescimento afetado. Além disso, os mesmos autores relataram que os mutantes para *gln1* mostraram-se avirulentos quando inoculados em cobaias de laboratório.

Análise por *microarray* das respostas a espécies reativas de nitrogênio de *H. capsulatum*, mostrou um aumento na expressão do gene *gln1* quando comparado com os níveis controle, sem indução ao estresse de espécies reativas nitrogênio (Nittler *et al.*, 2005). Nesse sentido acreditamos que um mesmo papel possa ser atribuído para esse gene de *P. brasiliensis* na condição de infecção e/ou de carência de fontes de nitrogênio.

O *singlet* DW26A06 de PbY-M Φ , apresentou similaridade com a PbAEST2266 de PbYM, o qual está anotado como gene que codifica a proteína de transferência fosfatidilglicerol/fosfatidilinositol de *Aspergillus oryzae*, apresentou um valor de E de alta significância (e-119) e porcentagem de cobertura de aproximadamente 49%. Embora as proteínas desta família, conhecida como proteínas transportadoras de fosfolipídeos (PLTP), sejam altamente conservadas entre organismos eucarióticos, sua exata função ainda não foi determinada. Porém, dados da literatura científica disponíveis até o momento, indicam estarem provavelmente envolvidas no tráfego de

lipídeos e nas vias de sinalização por lipídeos na célula (revisto por Phillips *et al.*, 2006).

O *singlet* DW02C05 de PbY-MΦ, apresentou similaridade com a PbAEST1545 de PbYM, a qual está anotada como gene *grr1* de *N. crassa*, o qual codifica uma proteína similar à proteína repressora regulada por níveis de glicose de *S. cerevisiae* (CA CAA89617). Embora a proteína GRR1 seja expressa em níveis constitutivos na célula, sob elevados níveis de glicose a GRR1p atua desreprimindo promotores de genes que codificam transportadores de glicose de baixa afinidade (HXT) (Özcan & Johnston, 1995). Em adição, experimentos com *S. cerevisiae* mutantes para o gene *grr1* apresentaram células com morfologia alongada, sensibilidade a estresse osmótico e carência de nitrogênio (Vallier *et al.*, 1994).

A tabela 6 apresenta os grupos de *contigs* e *singlets* da biblioteca PbY-MΦ que não apresentaram similaridade com nenhuma seqüência descrita no transcriptoma PbMY (Felipe *et al.*, 2003 e 2005). Descreveremos aqui alguns dos principais grupos relatados na tabela 6.

Tabela 6: Sequências do transcriptoma PbY-MΦ que não apresentaram similaridade com PbAESTs do transcriptoma das formas de M e Y de *P. brasiliensis* cultivado *in vitro* (Felipe *et al.*, 2003 e 2005) – as sequências de *P. brasiliensis* que potencialmente correspondem a novos genes ainda não descritos para esse fungo.

Sequências do transcriptoma da forma Y de <i>P. brasiliensis</i> MΦ ^(a)	Anotação ^(b)	Blastx nr e-value / Identidade
Grupo 13: <i>contig3</i> (2 ESTs, 386 nt, 68 aa) e <i>contig15</i> (5 ESTs, 523 nt, 25 aa)	Subunidade 1 da citocromo c oxidase de <i>Penicillium marneffei</i> (CA AAQ54924)	2e-28/95% ^(c) e 9e-05/80% ^(c)
Grupo 14: <i>contig12</i> (4 ESTs, 487 nt, 128 aa)	Subunidade 6 da NADH desidrogenase de <i>Epidermophyton floccosum</i> (AC AAW782470)	6e-25/ 70% ^(c)
Grupo 15: DW26D03 (618 nt, 104 aa)	Subunidade 2 da NADH desidrogenase de <i>Trichophyton rubrum</i> (CA CAA77186)	7e-24/ 77% ^(c)
Grupo 16: DW26D07 (287 nt, 57 aa)	Subunidade 1 da NADH desidrogenase de <i>Aspergillus niger</i> (CA AAW78244)	1e-15/ 77% ^(c)
Grupo 17: <i>contig8</i> (3 ESTs, 582 nt, 194 aa)	Proteína codifica na região intrônica I6 do gene COX1 de <i>Penicillium marneffei</i> (AC NP_943729)	2e-13/ 32% ^(c)
Grupo 18: DW26E09 (367 nt, 121 aa)	Proteína codifica na região intrônica I3 do gene COX1 de <i>Penicillium marneffei</i> (CA AAQ54927)	3e-17/ 43% ^(c)
Grupo 19: <i>contig7</i> (4 ESTs, 758 nt, 253 aa)	Proteína tipo transcriptase reversa (RT) de <i>Venturia inaequalis</i> (CA AAB95256)	2e-14/ 29%
Grupo 20: DW06G11 (1013 nt, 156 aa)	Proteína de interação com RNA de ciclofilina em <i>Paramecium tetraurelia</i> (CA CAC35733)	2e-10/ 25%
Grupo 21: DW07D06 (1299 nt, 74 aa)	Proteína transportadora de íons metálicos da família CorA (CA XP_755142)	6e-06/ 75%
Grupo 22: DW07E06 (299 nt, 48 aa)	Proteína hipotética FG10759.1 de <i>Gibberella zeae</i> cepa PH-1 (CA XP_390935)	9e-0/ 61%
Grupo 23: DW07G12 (999 nt, 126 aa)	Proteína hipotética CBG17156 de <i>Caenorhabditis briggsae</i> (CA CAE70527)	1e-04/ 25%
68 sequências: 6 <i>contigs</i> (16 ESTs) e 63 <i>singlets</i>	Sequência sem similares em banco de dados	-

(a) Para cada grupo de sequências encontra-se indicado o nome da *contig*, o número de ESTs agrupadas quando esta for uma *contig*, o tamanho da sequência em nucleotídeos (nt) e o tamanho da sequência em aminoácidos (aa).

(b) Resultado do Blastx mostrando a sequência depositada em banco de dados que resultou no melhor índice de similaridade.

(c) Resultados do Blastx obtidos de análise comparativa contra o banco de genoma mitocondrial de leveduras.

O grupo 13, formado pelas *contig3* e *contig15* de PbY-MΦ, apresentou similaridade com o gene que codifica a subunidade 1 da citocromo c oxidase (*cox1*) de *P. marneffei* (AC AAQ54924), com o valor de E de 2e-28 e similaridade de 95% para o melhor resultado de Blastx. Devido ao não agrupamento das *contig3* e *contig15* de PbY-MΦ em um único consenso, quando da utilização do programa CAP3, foi realizado um alinhamento adicional com o programa CLUSTALW do BioEdit das seqüências de aminoácidos deduzidas a partir das seqüências de nucleotídeos das *contig3* e *contig15*, com a seqüência de aminoácidos da proteína Cox1p de *P. marneffei*. A figura 10 mostra o resultado do alinhamento, onde se pode observar que o não agrupamento das *contig3* e *contig15* pelo programa CAP3, foi devido ao fato destas constituírem seqüências de regiões distintas com relação ao gene *cox1* de *P. marneffei*.

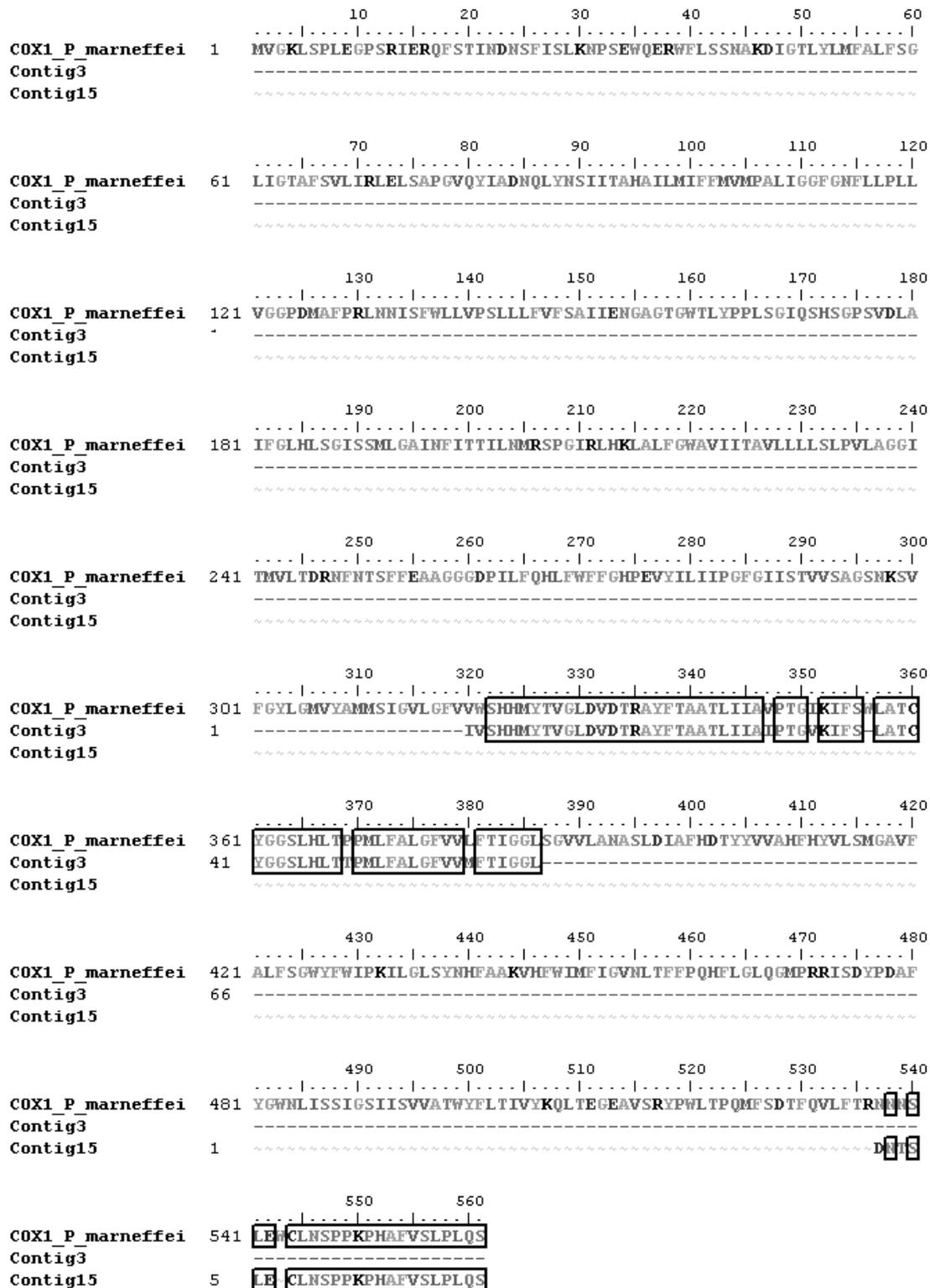


Figura 10: Alinhamento entre as seqüências deduzidas de aminoácidos das *contig3*, *contig15* de PbY-MΦ e Cox1p de *Penicillium marneffeii* (AC AAQ54924), usando o programa CAP3 disponível no BioEdit.

Análises realizadas com a ferramenta Blastx das seqüências da *contig8* e do *singlet* DW26E09 do transcriptoma PbY-MΦ, mostraram similaridades com os genes *cox1-i6* (AC AAQ54930) e *cox1-i3* (AC AAQ54927) do genoma mitocondrial *P. marneffei*, respectivamente. Os genes *cox1-i6* e *cox1-i3* pertencem ao grupo I de íntrons, os quais são encontrados em mRNAs mitocondriais de fungos, plantas e protistas. Como pode ser observado na **figura 11**, estas seqüências não se agruparam com as *contig3* e *contig15* PbY-MΦ pelo programa CAP3, por constituírem seqüências de regiões intrônicas distintas do gene *cox1* do genoma mitocondrial de *P. marneffei*. A presença de íntrons no gene *cox1* do banco de PbY-MΦ de *P. brasiliensis*, está de acordo com o descrito para outros organismos. Em *P. marneffei*, o gene *cox1* possui sete íntrons, todos com uma ORF. Em *S. cerevisiae* possui sete íntrons, *C. glabrata* três íntrons e *C. albicans* cinco íntrons (Woo *et al.*, 2003, Koszul *et al.*, 2003).

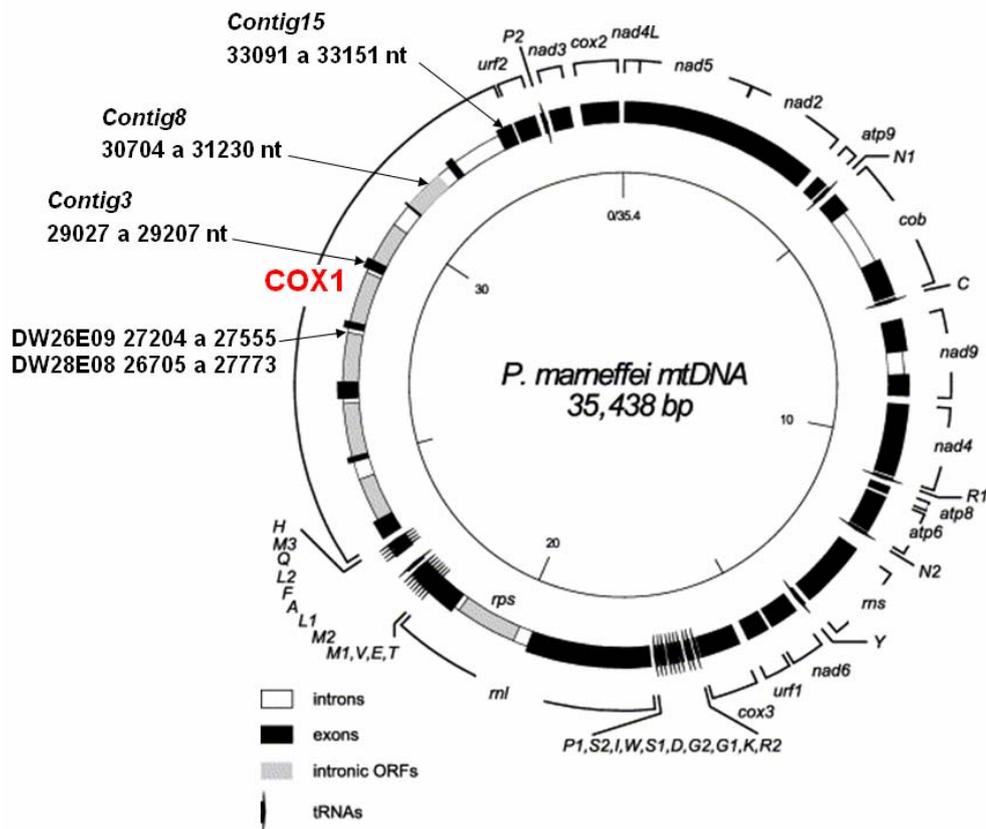


Figura 11: Mapa físico do genoma mitocondrial de *P. marneffei* mostrando o posicionamento das *contigs* e *singlets* do transcriptoma PbY-MΦ, que apresentaram similaridade com regiões do gene *cox1* desse fungo (Adaptado de Woo *et al.*, 2000).

A *contig12* e os *singlets* DW26D03 e DW26D07 de PbY-MΦ, apresentaram similaridade com genes mitocondriais que codificam subunidades da enzima NADH desidrogenase de fungos. A *contig12* apresentou similaridade com a subunidade 6 da NADH desidrogenase (*nad6*) de *Epidermophyton floccosum* (AC AAW78247), com um e-value de 6e-25 e similaridade de 70%. A figura 12 apresenta o alinhamento utilizando a ferramenta de alinhamento entre seqüências CLUSTALW disponível em <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>, entre a seqüência deduzida de aminoácidos da *contig12* com a seqüência de aminoácidos da proteína Nad6p de *E. floccosum*, o qual obteve 50% de identidade e 71% de similaridade. O *singlet* DW26D03 apresentou similaridade com a subunidade 1 (*nad1*) de *Aspergillus niger* (AC ABA33722), enquanto o *singlet* DW26D07 com a subunidade 2 (*nad2*) de *E. floccosum* (AC AAW78239) (Tabela 6).

```

NAD6_E_floccosum      MMQLNLYVDKLNNGFNSNILDILALISIMFGIYTIVCKNPVISVLFGLIGLSTISIYLIL 60
Ctg12_Pb              -FMFTIY-DNFYGYGYDIYLDITTYTMSMTFGTYTILNKNPVISIFFTMGLFSSISCYLFL 58
                       :.::* *:: *:. **   :*: ** ***: *****:* :****:* **:*
NAD6_E_floccosum      IGLTFIGLSYLLVYIGAVSILFLFILMLINIRISELVSTNNNYIPLAVLSMITLVYILGQ 120
Ctg12_Pb              IGTEFMGLSYLLVYIGAVSITFTFMLMTINIRISETITKTINSLPLATFSTILFIYILMI 118
                       ** *:***** * *:** ***** :...* :*:*:* * :*:*
NAD6_E_floccosum      KVITNVVQLNTFSSSLFEKSFKEWINYSNSLSWDTNLDITHTSAIGNIMYSNYSLWLII 180
Ctg12_Pb              NTPINTIDX----- 127
                       :. *.:
NAD6_E_floccosum      ISLILLAMVGSIVISIGR 199
Ctg12_Pb              -----

```

Figura 12: Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos deduzida a partir da *contig12* da biblioteca PbY-MΦ e a seqüência Nad6p de *Epidermophyton floccosum* (AC AAW78247), usando a ferramenta CLUSTALW disponível no endereço <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>.

Como descrito na tabela 6, no perfil transcricional de *P. brasiliensis* na interface de células de macrófagos foram descritos quatro genes, *cox1*, *nad1*, *nad2* e *nad6*, relacionados diretamente à cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, os quais não foram descritos no transcriptoma diferencial das formas de micélio e levedura de *P. brasiliensis* cultivados *in vitro* (Felipe *et al.*, 2003 e 2005).

O gene mitocondrial *cox1* codifica umas das três subunidades da enzima citocromo c oxidase, cujo papel parece ser muito importante em microrganismos em condições de infecção. A análise do perfil transcricional de *C. neoformans* por DDRT-PCR, em diferentes condições de crescimento como à temperatura de 30°C, à

temperatura fisiológica de 37°C e na condição de infecção de coelhos imunocomprometidos, revela que o transcrito *cox1* de *C. neoformans* foi detectado como sendo diferencialmente expresso na temperatura fisiológica 37°C bem como na condição de infecção (Rude *et al.*, 2002).

Partindo-se da hipótese de que alterações na expressão de genes ocorrem em condições que simulariam certas situações de patologia, Toffaletti e colaboradores (2003) utilizaram a técnica de DDRT-PCR para identificar transcritos expressos diferencialmente em sorotipos diferentes de *Cryptococcus neoformans* var. *gurbii* em condições de temperatura a 30° C e 37°C *in vitro* e após 2 e 7 dias de infecção mediante recuperação do fluido espinhal de coelhos imunocomprometidos. O gene *cox1* apresentou expressão diferencial nas condições de temperatura fisiológica de 37°C e na condição de infecção *in vivo*. Posterior análise por *Northern blot* comparando as duas condições de cultura *in vitro* a 30° C e 37°C, revelou diferenças tanto nos tamanhos e na abundância dos transcritos de *cox1*, sendo que a 37°C um transcrito adicional apresentou uma maior expressão, em pelo menos sete vezes, quando comparado com a condição de cultivo a 30° C. Diferenças de tamanhos em transcritos foram anteriormente relatados em *S. cerevisiae* relatam que esses transcritos maiores de *cox1* são subsequentemente processados em transcritos menores (Grivell, 1989).

Em fungos patogênicos, a função mitocondrial tem importante papel na detoxificação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além da produção de energia. Relatos na literatura indicam que genes envolvidos na produção de energia também são induzidos após exposição a espécies reativas de nitrogênio. A análise das respostas transcricionais de *H. capsulatum* a espécies reativas de nitrogênio revelou a indução de genes homólogos àqueles que codificam subunidade 12 da citocromo c oxidase (*cox12*), um homólogo da NADH desidrogenase alternativa, que facilita a transferência de elétrons da NADH para a ubiquinona, a proteína lançadeira (“*shuttle*”) entre os complexos I e III da cadeia de elétrons (Nittler *et al.*, 2005). Desta forma o aumento na expressão do gene *cox1* na condição de infecção empregada para *P. brasiliensis*, poderia sugerir uma resposta ao estresses oxidativo em virtude do ambiente hostil encontrado no fagossomo.

O complexo NADH desidrogenase (NAD), também conhecido como complexo I, tem papel central na fosforilação oxidativa catalisando a oxidação de NADH para ubiquinona, em uma reação que resulta na transferência de prótons através da membrana mitocondrial. O complexo I é composto por diversas proteínas codificadas

tanto no genoma nuclear quanto mitocondrial, sendo que sete polipeptídeos são codificados no genoma mitocondrial (*nad1*, 2, 3, 4, 4L, 5, e 6), embora algumas leveduras como *S. cerevisiae* e *S. pombe* não possuam genes mitocondriais para a NADH desidrogenase (Nosek & Fukuhara, 1994). A influência da NADH desidrogenase foi estudada na filamentação de *C. albicans* por McDonough e colaboradores (2002). Em condições de crescimento em etanol ou glicerol, as quais simulariam as prováveis fontes de dois carbono disponíveis no fagossomo de células de mamíferos, o mutante para a atividade do complexo NADH desidrogenase não apresentou crescimento filamentosos, sugerindo a necessidade da função NADH desidrogenase para a virulência de *C. albicans*. O aparecimento de seis ESTs similares a genes que codificam subunidades do complexo I, *nad1* (1 EST), *nad2* (1 EST) e *nad6* (4 ESTs), na condição de infecção do fungo *P. brasiliensis* em fagossomo de macrófagos, provavelmente um ambiente pobre em fonte de carbono, pode sugerir a necessidade de uma produção maior de energia através de maior atividade da cadeia de transporte de elétrons.

Das 474 seqüências analisadas da biblioteca PbY-MΦ, 68 seqüências, agrupadas entre seis *contigs* (*contig1*, *contig2*, *contig6*, *contig9*, *contig13* e *contig16*) e 63 *singlets* não apresentaram índice de similaridade com nenhuma seqüência conhecida de outro organismo depositada no banco nr ou dbEST. Perfis transcricionais de fungos em condições de infecção similares ao nosso modelo, também revelaram um elevado número de genes sem anotação. Lorenz e colaboradores (2004) relataram cerca de 18% de genes sem anotação em *C. albicans* após infecção de células de macrófagos de camundongos. No transcriptoma diferencial das formas de micélio e levedura de *P. brasiliensis* cultivados *in vitro*, cerca de 30% das ESTs não apresentaram similaridade com nenhuma outra seqüência anotada no banco nr (Felipe *et al.*, 2003 e 2005).

Neste trabalho foram observadas 10 *contigs* e 64 *singlets* que não apresentaram similaridade com nenhuma seqüência anotada para o fungo *P. brasiliensis*. Destes 74 grupos 14 apresentaram similaridades com seqüências de outros organismos. A maioria, 13 ESTs agrupadas em 6 grupos, apresentou similaridade com genes mitocondriais que codificam proteínas envolvidas na cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria. Este perfil transcricional, não descrito anteriormente no transcriptoma das formas de micélio e levedura de *P. brasiliensis* cultivado *in vitro* (Felipe *et al.*, 2003 e 2005), aliado aos dados relatados na literatura discutida acima, pode sugerir uma possível resposta do

fungo internalizado ao estresse oxidativo do fagossomo, o que está de acordo com o ambiente hostil desta organela de macrófagos de hospedeiros.

5.5 Análise das seqüências relacionadas ao gene *icl* de *P. brasiliensis*

A partir da análise do transcriptoma das formas de micélio e levedura de *P. brasiliensis*, cultivadas *in vitro* (Felipe *et al.*, 2003 e 2005), verificou-se a existência de 10 PbAESTs relacionadas ao gene isocitrato liase (*icl*) de outros organismos, o qual codifica uma das enzimas regulatórias do ciclo do glioxalato. Tendo em vista a importância do ciclo do glioxalato na virulência de microrganismos, como descrito para *C. albicans* (Lorenz & Fink, 2001), *C. neoformans* (Rude *et al.*, 2002) e *M. tuberculosis* (Muñoz-Elías & McKinney, 2005), o nosso grupo tem apresentado interesse no estudo relacionado à função e regulação dessa via metabólica em *P. brasiliensis*. Nesse sentido, a análise dos níveis de expressão de genes que codificam as enzimas do ciclo do glioxalato nesse fungo foi recentemente conduzida em nosso laboratório, revelando um aumento no acúmulo dos mRNAs *icl* (isocitrato liase) e *mls* (malato sintase) quando do co-cultivo de *P. brasiliensis* e macrófagos murinos e também quando este foi cultivado *in vitro*, em condições de carência nutricional (Derengowski, 2006). Os resultados obtidos sugerem um possível papel desses genes na adaptação do fungo ao ambiente nutricionalmente pobre encontrado no interior da célula hospedeira, possibilitando a utilização de compostos de dois carbonos, tais como os produtos da oxidação lipídica, para a produção de energia. Dessa forma, visando a complementar os estudos citados acima, e dentro do contexto do interesse de nosso grupo na caracterização de genes potencialmente relacionados à interação patógeno-hospedeiro, um outro aspecto abordado nessa dissertação foi a caracterização de prováveis genes *icl* de *P. brasiliensis* (Felipe *et al.*, 2005).

Conforme mostrado na tabela 7, o programa CAP3 agrupou as 10 PbAESTs obtidas no projeto transcriptoma de *P. brasiliensis* que apresentaram similaridade com genes *icl* em 4 *contigs* distintas. Análises subseqüentes das seqüências de nucleotídeos dessas *contigs*, empregando-se a ferramenta Blastx, mostraram que as *contigs* 1, 2 e 3 apresentam similaridade com a seqüência da enzima isocitrato liase (ICL) de *C. immitis* (AC AAK72548), com aproximadamente 1617 nucleotídeos, que codifica uma proteína de 538 resíduos de aminoácidos. Contudo, a *contig4* além de apresentar similaridade com a isocitrato liase de *A. fumigatus* (AC EAL89442), também apresentou

similaridade com a enzima metilisocitrato liase (MCL) de *E. nidulans* (AC CAI65406), que codifica uma proteína de 604 resíduos de aminoácidos, como apresentado na tabela 7.

Tabela 7. PbAESTs relacionadas ao gene isocitrato liase (*icl*) obtidas pelo projeto transcriptoma das formas de M e Y de *P. brasiliensis* cultivado *in vitro* (Felipe *et al.*, 2003 e 2005), após análise pelo programa CAP3.

Contig	PbAESTs	Blastx	e-value
Contig1 (757 nt)	PBDEX-Y1-106t_D10	Isocitrato liase de <i>Coccidioides immitis</i> (AC AAK72548)	3e-106
	PBDRS-Y1-027t_F08		
Contig2 (803 nt)	PBDEX-Y1-104t_A06	Isocitrato liase de <i>Coccidioides immitis</i> (AC AAK72548)	3e-116
	PBDEX-Y1-091t_A06		
	PBDEX-Y1-045t_A11		
Contig3 (784 nt)	PBDEX-Y1-106t_B08	Isocitrato liase de <i>Coccidioides immitis</i> (AC AAK72548)	3e-84
	PBDEX-M1-028t_G11		
Contig4 (993 nt)	PBDIP-Y1-025t_D09	Isocitrato liase de <i>Aspergillus fumigatus</i> (AC EAL89442) e Metilisocitrato liase de <i>Emericella nidulans</i> (AC CAI65406)	4e-92 e 3e-91
	PBDEX-M1-040t_C02		
	PBDSP-Y1-046t_E10		

O esquema mostrado na figura 13 exemplifica como provavelmente estão distribuídas as *contigs* 1, 2 e 3 ao longo da seqüência do gene de *icl* de *C. immitis*. Para verificar se estas *contigs* correspondem a um mesmo gene *icl*, foram desenhados oligonucleotídeos específicos para regiões internas das seqüências referentes as *contigs*. A partir de clones de cDNAs contendo o inserto correspondente às PbAESTs PBDEX-Y1-106t_D10, PBDEX-Y1-104t_A06, PBDEX-M1-028t_G11 e PBDEX-M1-040t_C02, que compõem as *contigs* 1, 2 3, e 4 respectivamente (tabela 7), os oligonucleotídeos listados na figura 15 foram utilizados para posterior seqüenciamento.

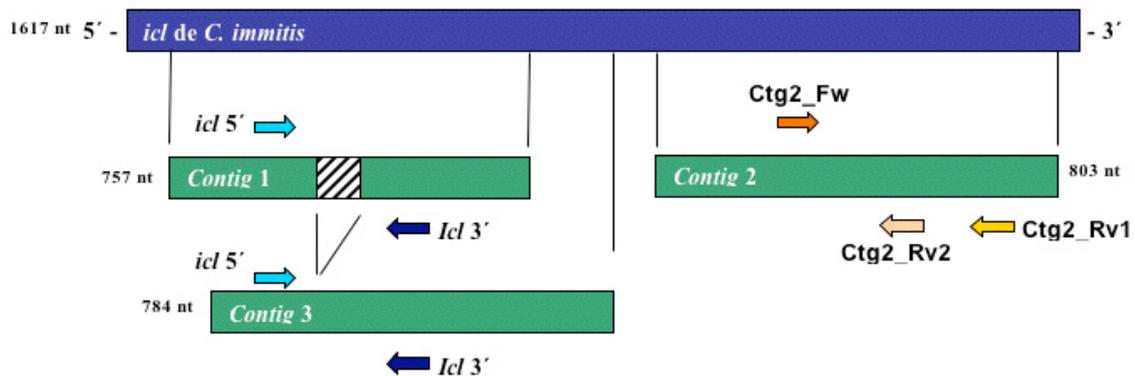


Figura 13: Esquema do provável posicionamento das *contigs* 1, 2 e 3 (retângulos verdes) e dos oligonucleotídeos internos (setas) em relação à sequência do gene de *icl* de *C. immitis* (retângulo azul).

Baseando-se nas seqüências das *contigs* relacionadas ao gene *icl* descritas no projeto transcriptoma de *P. brasiliensis* (Felipe *et al.*, 2003 e 2005), em adição aos resultados obtidos pelo seqüenciamento dos clones referentes às PbAESTs citadas no parágrafo anterior, foram geradas as seguintes seqüências consenso: **Consenso_Ctg_1e3**, composta pelas seqüências das *contigs* 1 e 3 anteriormente descritas e pelas seqüências adicionais geradas neste trabalho, correspondentes às PbAESTs PBDEX-Y1-106t_D10 e PBDEX-Y1-104t_A06; e **Consenso_Ctg2**, composta pela seqüência da *contig2* e pela seqüência adicional geradas neste trabalho, referente à PbAEST PBDEX-M1-028t_G11. Estas seqüências consenso foram submetidas às comparações de similaridade com o banco nr usando o programa Blastx.

Conforme mostrado na tabela 8, o melhor resultado dos alinhamentos de ambas as seqüências consenso apresentou similaridade com a seqüência deduzida de aminoácidos da proteína ICL de *C. immitis*.

Tabela 8: Resultado das análises de similaridade das seqüências consenso geradas a partir das *contigs* 1, 2 e 3 da biblioteca PbMY, comparadas às seqüências depositadas no banco nr, utilizando a ferramenta Blastx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Seqüência Consenso Pb ^(a)	Blastx ^(b)	e-value
Consenso_Ctg_1e3 (869 nt – 210 aa)	Isocitrato liase 2 de <i>P. brasiliensis</i> (AC AAQ75802)	9e-55
	Isocitrato liase de <i>C. immitis</i> (AC AAK72548)	1e-53
	Isocitrato liase de <i>Aspergillus nidulans</i> (AC XP_663238)	3e-52
	Isocitrato liase de <i>E. nidulans</i> (AC CAI65406)	5e-51
Consenso_Ctg2 (714 nt – 238 aa)	Isocitrato liase de <i>C. immitis</i> (AC AAK72548)	1e-116
	Metilisocitrato liase de <i>A. niger</i> (ABC73716)	3e-114
	Isocitrato liase de <i>E. nidulans</i> (AC CAI65406)	9e-113
	Isocitrato liase de <i>Aspergillus nidulans</i> (AC XP_663238)	9e-113

(a) Identificação da seqüência consenso e o tamanho da seqüência em nucleotídeos (nt) e da seqüência deduzida de aminoácidos.

(b) Resultado do Blastx mostrando a seqüência depositada em banco de dados que resultou no melhor índice de similaridade.

A partir das seqüências deduzidas de aminoácidos das *contigs* 1, 2 e 3, foram realizados alinhamentos pelo programa CLUSTALW. O alinhamento da seqüência predita de aminoácidos relativa à seqüência Consenso_Ctg_1e3 com a seqüência de resíduos de aminoácidos de ICL de *C. immitis* (AC AAK72548) apresentou 84% de identidade e 89% de similaridade. A seqüência deduzida de resíduos de aminoácido da seqüência Consenso_Ctg2 também apresentou alta similaridade (91%) com a seqüência de ICL de *C. immitis*. Entretanto, como observado na figura 14, as seqüências Consenso_Ctg_1e3 e Consenso_Ctg2 alinharam em regiões distintas da proteína ICL de *C. immitis*. Estes resultados sugerem que estes consensos provavelmente referem-se a um mesmo gene *icl* de *P. brasiliensis*.

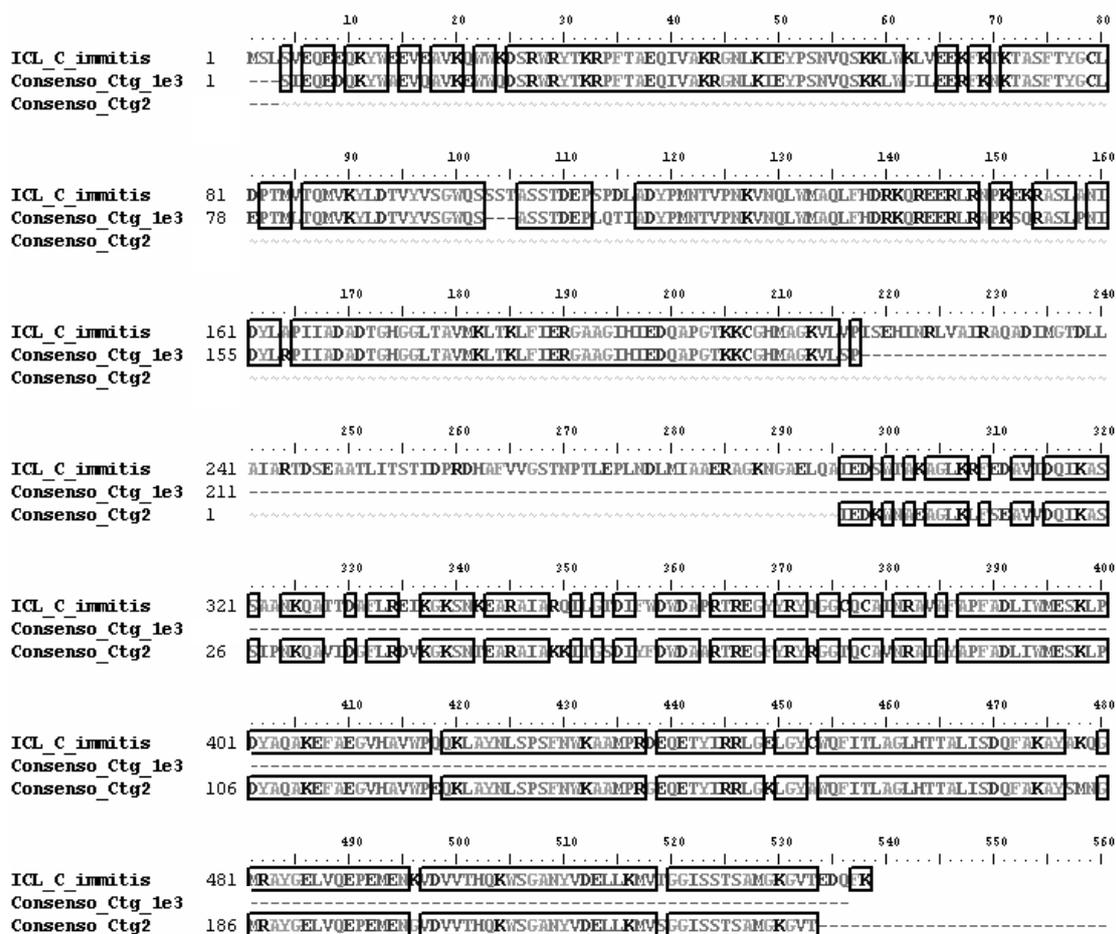


Figura 14: Alinhamento entre as seqüências deduzidas de aminoácido das seqüências Consenso_Ctg_1e3 e Consenso_Ctg2 de *P. brasiliensis* e ICL de *Coccidioides immitis* (AC AAK72548), usando o programa BioEdit.

Com o objetivo de determinar se a *contig4* codifica uma proteína distinta da *icl* de *P. brasiliensis*, foram realizados experimentos de seqüenciamento do clone referente à PbAEST PBDEX-M1-028t_G11 (tabela 7), além de experimento de *Southern blot*. Com base nos resultados obtidos pelo seqüenciamento, em adição às seqüências que compõem a *contig4*, foi gerada a seqüência Consenso_Ctg4. Na figura 15 é apresentado o resultado de alinhamento através do programa CLUSTALW, da seqüência deduzida de aminoácidos relativa à seqüência Consenso_Ctg4, com a seqüência de resíduos de aminoácido da proteína metiliscitrato liase (*mcl*) de *E. nidulans*, com a qual apresentou um índice de 85% de identidade e 95% de similaridade.

contrapartida, o resultado entre as seqüências da proteína MCL de *E. nidulans* e a seqüência predita de aminoácidos da Consenso_Ctg4, confirma o resultado apresentado na figura 17. Estes resultados corroboram a hipótese de que as seqüências Consenso_Ctg_1e3 e Consenso_Ctg4 codificam as enzimas ICL e MCL, respectivamente.

SeqA	Name	Len(aa)	SeqB	Name	Len(aa)	Score
1	ICL_C_immitis	538	2	MCL_E_nidilans	604	44
1	ICL_C_immitis	538	3	Consenso_Ctg4	180	46
2	MCL_E_nidilans	604	3	Consenso_Ctg4	180	85

MCL_E_nidulans	MLRSIPRRVPRRLPIFTTTATAGGPSRLAQAFTCGYLMSPPSSLPPVQPPVSSSTLPSDS	60
Consenso_Ctg4	-----	
ICL_C_immitis	-----	
MCL_E_nidulans	YQLLSTADKAGDAEDALYEQQIKDVEAWWNSPRFEGIKRPYSAADVWSKRGSLQOQTPSS	120
Consenso_Ctg4	-----KAVTEWNTPRYEGIRRPYSAEAVVSKRGSLQOQTPSS	38
ICL_C_immitis	-----MSLSVEQEEQKYWEEVEAVKQWKKDSRWRYTKRPFTAEOIVAKRGNLKIEYPSN	54
	: * * * : * : : * * * : * : * * * : * : * * *	
MCL_E_nidulans	LMARKLFNLLNERAAENKPVHTMGAIDPVQMTQQAPNQEVLYVSGWACSSVLTITTTNEVSP	180
Consenso_Ctg4	IMARKLFNLLNERAKTGKPVHTLGAIDPVQMTQQAPNQEVLYVSGWACSSVLTITTTNEVSP	98
ICL_C_immitis	VQSKKLWKLVEEKFKTKTASFYTGCLDPTMTVMQVKYLDTVVYVSGWQSSSTASSTDEPSS	114
	: * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *	
MCL_E_nidulans	DFGDYPYNTVVPNQVQRLFKAQQLHDKRHWDAARRKMTPEQRKSTPYIDYMRPIIADGDTGH	240
Consenso_Ctg4	DFGDYPYNTVVPNQVQRLFKAQMHDSKQWDSRRKLSPEERKNTPYTDFMRPIVADGDTGH	158
ICL_C_immitis	DLADYPMNTVVPNKVNQLWMAQLFHDRKQREERLRNPKEKRASLANIDYLAPIIADADTGH	174
	* : *	
MCL_E_nidulans	GGLTAVLKLAKLFAENGAAAVHFEDQMGGKCKGHLAGKVLVPIGEHINRLVATRFQWDM	300
Consenso_Ctg4	GGLTAVLKIAKLFAENGAAAVH-----	180
ICL_C_immitis	GGLTAVMKLTKLFIERGAAGIHIEDQAPGTTKCGHMAGKVLVPISEHINRLVAIRAQADI	234
	* *	
MCL_E_nidulans	MGVENLVIARTDSESGKLLSSAIDVRDHEFIIIGVT-EESEPLAETLOAMEREGAAPSEID	359
Consenso_Ctg4	MGTDLLAIARTDSEAATLITSTIDPRDHFVVGSTNPTLEPLNDLMIAAERAGKNGAELQ	294
ICL_C_immitis	-----	
	: :	
MCL_E_nidulans	AFELDWWKRHLVTFDEAVDAHLEAEGAP--QAARDAYKKRVKENPDLITRRRELANDY	417
Consenso_Ctg4	-----	
ICL_C_immitis	AIEDSWTAKAGLKRFEIDAVIDQIKASSAANKQATTD AFLREIKGKSNK---EARAIARQI	351
	: :	
MCL_E_nidulans	TKTPVWVWCDIPRTREGFYHYRAGFPAATKRAKEFGPYADLLWVETGDPNVEKAAKLAGE	477
Consenso_Ctg4	-----	
ICL_C_immitis	LGTDIFWWDAPRTREGYRYRQGGCQCAINRAVAFAPFADLIWMESKLPDYAQAQEFVAG	411
	: :	
MCL_E_nidulans	VRAALPGKKLVYNLSPSFNWMQGGFDEASLKSFIWDLAQHGFLVQLISLAGLHSGATITA	537
Consenso_Ctg4	-----	
ICL_C_immitis	VHAVVPQKLAYYNLSPSFNWK-AAMPREDEQETYIRRLGELGYCWFITLAGLHTTALISD	470
	: :	
MCL_E_nidulans	ELSRFAFKDEGMLAYVRLIQAREKELGVDVLTHQKWSGAPYMDGIVGAIQSGSSSSKSMGE	597
Consenso_Ctg4	-----	
ICL_C_immitis	QFAKAYAKQGMRAYGELVQPEPEMENKVDVVTHQKWSGANVYVDELLKMTGGISSTSAMGK	530
	: :	
MCL_E_nidulans	GNTKGF- 604	
Consenso_Ctg4	-----	
ICL_C_immitis	GVTEDQFK 538	
	: :	

Figura 16: Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos das proteínas ICL de *C. immitis* (AC AAK72548), MCL de *E. nidulans* (AC CAI65406) e a seqüência deduzida de aminoácidos da *contig4* de *P. brasiliensis*, usando o programa CLUSTALW.

Na figura 17 é mostrado o resultado do experimento de *Southern blot*, verificando que houve diferentes padrões de hibridização de fragmentos de DNA relativo às PbAESTs PBDEX-Y1-106t_D10 (*contig1*) e PBDEX-M1-040t_C02 (*contig4*), que provavelmente correspondem às seqüências dos genes *icl* e *mcl* de *P. brasiliensis*, prováveis ortólogos dos respectivos genes de *C. immitis* e *E. nidulans*. Além disso, como pode ser observado nos controles, Ctg1 e Ctg4, em ambas as membranas (a) e (b), ocorreu um padrão distinto de hibridização dos respectivos fragmentos PBDEX-Y1-106t_D10 e PBDEX-M1-040t_C02.

Os resultados da análise do *Southern blot*, juntamente com os resultados obtidos pelos alinhamentos apresentados nas figuras 16, 17 e 18, sugerem que a seqüência Consenso_Ctg4 codifica a provável proteína MCL de *P. brasiliensis*, enquanto as seqüências que compõem o Consenso_Ctg1e3 e Consenso_Ctg2 provavelmente correspondem ao gene *icl* de *P. brasiliensis*.

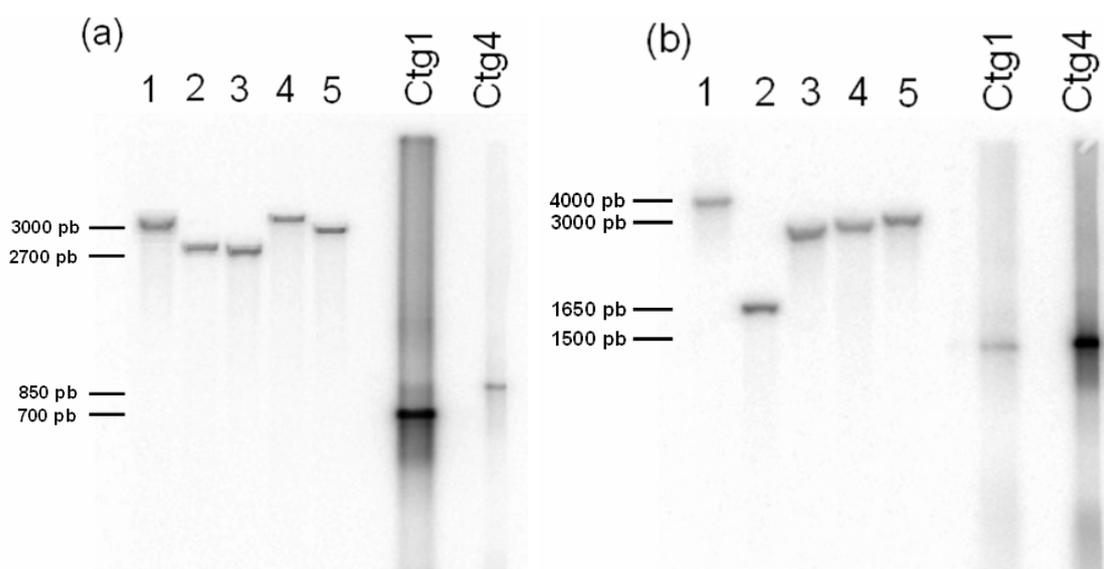


Figura 17: Southern blot genômico de *P. brasiliensis*. Padrão de hibridização dos cDNAs relativos às seqüências referentes às *contigs* 1 e 4. Cerca de 15 µg de DNA genômico de *P. brasiliensis* foram digeridos com diferentes enzimas de restrição, separado por eletroforese em gel de agarose 1,5 %, transferido para membrana de nylon (Hybond-N⁺, Amersham Biosciences) e posteriormente hibridizado com as sondas radioativas correspondentes às seqüências PBDEX-Y1-106t_D10, que compõe a *contig1*, e PBDEX-M1-040t_C02, que compõe a *contig4*. **Poços 1 a 5:** Digestão do DNA genômico com as enzimas *BamH* I, *Bgl* II, *EcoR* I, *Xba* I e *Xho* I, respectivamente. **Poços Ctg1 e Ctg4:** DNA dos clones PBDEX-Y1-106t_D10 e PBDEX-M1-040t_C02, utilizados como controles positivos, uma vez que foram agrupados nas *contigs* 1 e 4, respectivamente. Os tamanhos aproximados dos fragmentos de DNA genômico resultantes da hibridização com as sondas específicas estão apresentados ao lado de cada painel.

A existência de mais de uma isoforma da enzima isocitrato liase foi recentemente relatada em *M. tuberculosis* por Muñoz-Elías & McKinney (2005). Na levedura *S. cerevisiae* também foi detectada a presença de duas seqüências distintas que apresentaram similaridade ao gene *icl* de outros organismos (*icl1* e *icl2*). Contudo, a introdução de múltiplas cópias de *icl2* ao mutante $\Delta icl1$ não restaurava a capacidade da levedura em produzir energia a partir de compostos de dois carbonos (Heinisch *et al.*, 1996). Trabalhos posteriores realizados por Luttkik e colaboradores (2000), mostraram que mutantes *icl2* apresentavam atividade isocitrato liase similar àquela do tipo selvagem. Entretanto esses isolados mutantes não apresentavam atividade metilisocitrato liase específica, mostrando que o gene *icl2* codifica a enzima MCL, e não a enzima ICL. Resultados similares foram obtidos nesse trabalho, no qual a identificação de domínios característicos da enzima isocitrato liase na *contig4* levou à suposição inicial de que esse gene poderia codificar uma isoforma da enzima ICL de *P. brasiliensis*. As análises posteriores realizadas, entretanto, sugerem que a seqüência Consenso_Ctg4 de *P. brasiliensis* refere-se ao gene *mcl*. No entanto, o seqüenciamento dos clones de cDNA de tamanho completo faz-se necessário para a melhor caracterização desses genes de *P. brasiliensis*. Dessa forma, embora outros experimentos sejam necessários para confirmar a atividade específica das enzimas ICL e MCL de *P. brasiliensis*, nossos resultados sugerem que esse fungo apresenta as correspondentes vias metabólicas, ciclo do glioxalato e ciclo do metilcitrato.

6- PRINCIPAIS RESULTADOS E CONCLUSÕES

Embora as análises das ESTs da biblioteca PbY-MΦ que apresentaram similaridades com seqüências descritas no banco de ESTs das bibliotecas das formas de micélio e levedura de *P. brasiliensis* cultivadas *in vitro* apontem uma grande representatividade de genes que compõem a maquinaria traducional da mitocôndria, o que poderia significar um problema oriundo da estratégia adotada na construção da biblioteca de cDNA PbY-MΦ, estes resultados podem sugerir uma importância do papel desta organela na condição de células de macrófagos por esse fungo, conforme descrito para outros modelos de infecção de células de mamíferos por outros fungos dimórficos, patogênicos para o homem.

As ESTs do banco PbY-MΦ que não apresentaram nenhuma similaridade com seqüências descritas no banco de ESTs das bibliotecas das formas de micélio e levedura de *P. brasiliensis* cultivadas *in vitro* foram divididas em dois grupos: 1) ESTs que apresentaram similaridades com genes de outros organismos, em sua maioria genes que codificam proteínas pertencentes à cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, revelando uma provável adaptação ao estresse oxidativo e/ou nutricional encontrado em fagossomos de células de macrófagos; 2) ESTs que não apresentaram similaridades com seqüências já descritas em outros organismos, o que poderia indicar uma expressão de genes específicos do fungo *P. brasiliensis* na condição de infecção de células de macrófagos.

Outra abordagem realizada neste trabalho referiu-se à uma análise dos prováveis genes *icl*, anteriormente descritos pelo projeto transcriptoma de *P. brasiliensis* (Felipe *et al.*, 2005), uma vez que a ativação do ciclo do glioxalato é descrita em diversos modelos de infecção de células de mamíferos por patógenos intracelulares facultativos.

As análises de quatro *contigs* de *P. brasiliensis* que apresentaram similaridade com o gene *icl* de outros organismos sugerem que três destas correspondem ao provável gene *icl* desse organismo. Além disso, sugerimos que a quarta *contig* anteriormente descrita provavelmente corresponda ao gene *mcl* de *P. brasiliensis*, o qual codifica a enzima metilisocitrato liase, também associada à utilização de fontes simples de carbono (3C), uma condição comumente encontrada no fagossomo.

7 - PERSPECTIVAS

1. Construção de uma nova biblioteca de cDNA nas mesmas condições adotadas no contexto deste trabalho, porém com o uso de uma estratégia diferente da adotada neste trabalho.
2. Geração de um maior número de ESTs, visando uma melhor descrição do transcriptoma de *P. brasiliensis* no contexto da interação com a célula hospedeira.
3. Confirmação dos níveis de expressão, por meio de experimentos de *real time* PCR e/ou *Northern blot*, dos genes mais representados na biblioteca PbY-MΦ.
4. Seqüenciamento completo dos clones de cDNAs que compõem as *contigs* com similaridades com os genes isocitrato liase e metilisocitrato liase.
5. Testar os níveis de expressão de ambos os genes de *P. brasiliensis*, *icl* e *mcl*, em diferentes condições de cultivos que simulariam as condições encontradas no interior de fagossomos de células de macrófagos.
6. Análise das seqüências genômicas dos genes *icl* e *mcl*, de forma a identificar e caracterizar suas regiões promotoras, um aspecto ainda pouco conhecido em *P. brasiliensis*.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad A, Gomez I, Velez P, Restrepo A. Adrenal function in paracoccidioidomycosis: a prospective study in patients before and after ketoconazole therapy. *Infection*. 1986; 14(1):22-26.
- Abremski K, Hoess R. Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J Biol Chem*. 1984;259(3):1509-14.
- Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merril CR, Wu A, Olde B, Moreno RF, et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*. 1991; 252(5013):1651-6.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990; 215(3):403-10.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25(17):3389-402.
- Aristizabal BH, Clemons KV, Stevens DA, Restrepo A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. *Infect Immun*. 1998; 66(11):5587-91.
- Arnold I, Pfeiffer K, Neupert W, Stuart RA, Schagger H. Yeast mitochondrial F₁F₀-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J*. 1998;17(24):7170-8.
- Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquati S, Miyaji M, de Camargo ZP, Gomes GM, Franco M, Montenegro MR. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg*. 1998; 58(4):505-12.
- Barrientos A, Barros MH, Valnot I, Rotig A, Rustin P, Tzagoloff A. Cytochrome oxidase in health and disease. *Gene*. 2002; 286(1):53-63.
- Bava AJ, Mistchenko AS, Palacios MF, Estevez ME, Tiraboschi NI, Sen L, Negroni R, Diez RA. Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients. *Microbiol Immunol*. 1991; 35(3):167-74.
- Baxevanis AD, Quellet, BF. Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins. 2001, 2nd edition, Wiley-Liss, Inc.
- Beauvais A, Bruneau JM, Mol PC, Buitrago MJ, Legrand R, Latge JP. Glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. *J Bacteriol*. 2001; 183(7):2273-9.

- Benard G, Hong MA, Del Negro GM, Batista L, Shikanai-Yasuda MA, Duarte AJ. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 54(1):7-12.
- Blasi E, Pitzurra L, Puliti M, Chimienti AR, Mazzolla R, Barluzzi R, Bistoni F. Differential susceptibility of yeast and hyphal forms of *Candida albicans* to macrophage-derived nitrogen-containing compounds. *Infect Immun.* 1995; 63(5):1806-9.
- Bogdan C, Thuring H, Dlaska M, Rollinghoff M, Weiss G. Mechanism of suppression of macrophage nitric oxide release by IL-13: influence of the macrophage population. *J Immunol.* 1997;159(9):4506-13.
- Borelli D. Hipótesis sobre ecología de *Paracoccidioides*. *Dermatol Venez.* 1961. 3: 130-32.
- Brandhorst T, Klein B. Cell wall biogenesis of *Blastomyces dermatitidis*. Evidence for a novel mechanism of cell surface localization of a virulence-associated adhesin via extracellular release and reassociation with cell wall chitin. *J Biol Chem.* 2000 17; 275(11):7925-34.
- Brigido MM, Walter ME, Oliveira AG, Inoue MK, Anjos DS, Sandes EF, Gondim JJ, Carvalho MJ, Almeida NF Jr, Felipe MS. Bioinformatics of the *Paracoccidioides brasiliensis* EST Project. *Genet Mol Res.* 2005;4(2):203-15.
- Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6(2):89-117.
- Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA. In vivo and in vitro activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. *J Immunol.* 1988; 140(8):2786-9.
- Cabezón E, Butler PJ, Runswick MJ, Walker JE. Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH. *J Biol Chem.* 2000; 275(33):25460-4.
- Cabezón E, Runswick MJ, Leslie AG, Walker JE. The structure of bovine IF(1), the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase. *EMBO J.* 2001; 20(24):6990-6.
- Camargo ZP, Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol.* 2000; 17(2):41-8.
- Cano LE, Arango R, Salazar ME, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. *J Med Vet Mycol.* 1992; 30(2):161-8.
- Carvalho MJ, Amorim Jesuino RS, Daher BS, Silva-Pereira I, de Freitas SM, Soares CM, Felipe MS. Functional and genetic characterization of calmodulin from the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol.* 2003; 39(3):204-10.

- Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun.* 1999; 67(8):3703-13.
- Chan J, Tanaka K, Carroll D, Flynn J, Bloom BR. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1995; 63(2):736-40.
- Clemons KV, Feldman D, Stevens DA. Influence of oestradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Gen Microbiol.* 1989; 135(6):1607-17.
- Coutinho, Z.F., da Silva, D., Lazéra, M., Petri, V., de Oliveira, R.M., Sabroza, P.C., Wanke, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad. Saúde Pública.* 2002; 18:1441-1454.
- da Silva SP, Borges-Walmsley MI, Pereira IS, Soares CM, Walmsley AR, Felipe MS. Differential expression of an hsp70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mol Microbiol.* 1999; 31(4):1039-50.
- Debono M, Gordee RS. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annu Rev Microbiol.* 1994; 48:471-97.
- Decoster E, Simon M, Hatat D, Faye G. The MSS51 gene product is required for the translation of the COX1 mRNA in yeast mitochondria. *Mol Gen Genet.* 1990; 224(1):111-8.
- Derengowski LS. Análise da expressão gênica de potenciais fatores de virulência do fungo *P. brasiliensis* submetido a diferentes condições experimentais. 2006. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasil.
- Devenish RJ, Prescott M, Roucou X, Nagley P. Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1458(2-3):428-42.
- Dienhart M, Pfeiffer K, Schagger H, Stuart RA. Formation of the yeast F₁F₀-ATP synthase dimeric complex does not require the ATPase inhibitor protein, Inh1. *J Biol Chem.* 2002; 277(42):39289-95.
- Douglas CM, D'Ippolito JA, Shei GJ, Meinz M, Onishi J, Marrinan JA, Li W, Abruzzo GK, Flattery A, Bartizal K, Mitchell A, Kurtz MB. Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41(11):2471-9.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 1998; 8(3):175-85.
- Fan W, Kraus PR, Boily MJ, Heitman J. *Cryptococcus neoformans* gene expression during murine macrophage infection. *Eukaryot Cell.* 2005; 4(8):1420-33.

- Feitosa Ldos S, Cisalpino PS, dos Santos MR, Mortara RA, Barros TF, Morais FV, Puccia R, da Silveira JF, de Camargo ZP. Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol.* 2003; 39(1):60-9.
- Felipe MS, Andrade RV, Arraes FB, Nicola AM, Maranhao AQ, Torres FA, Silva-Pereira I, Pocas-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LM, Andrade PA, Tavares AH, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, Network P, Pereira M, Jesuino RS, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS, Barbosa MS, Martins NF, Fachin AL, Cardoso RS, Passos GA, Almeida NF, Walter ME, Soares CM, Carvalho MJ, Brigido MM. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem.* 2005; 280(26):24706-14. Epub 2005 Apr 22.
- Felipe MS, Andrade RV, Petrofeza SS, Maranhao AQ, Torres FA, Albuquerque P, Arraes FB, Arruda M, Azevedo MO, Baptista AJ, Bataus LA, Borges CL, Campos EG, Cruz MR, Daher BS, Dantas A, Ferreira MA, Ghil GV, Jesuino RS, Kyaw CM, Leitao L, Martins CR, Moraes LM, Neves EO, Nicola AM, Alves ES, Parente JA, Pereira M, Pocas-Fonseca MJ, Resende R, Ribeiro BM, Saldanha RR, Santos SC, Silva-Pereira I, Silva MA, Silveira E, Simoes IC, Soares RB, Souza DP, De-Souza MT, Andrade EV, Xavier MA, Veiga HP, Venancio EJ, Carvalho MJ, Oliveira AG, Inoue MK, Almeida NF, Walter ME, Soares CM, Brigido MM. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast.* 2003; 20(3):263-71.
- Fisher SH. Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la difference! *Mol Microbiol.* 1999; 32(2):223-32.
- Figueiredo F, Alves LM, Silva CL. Tumour necrosis factor production in vivo and in vitro in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. *Clin Exp Immunol.* 1993; 93(2):189-94.
- Florez AM, Oviedo A, Cardona A, Herrera M, Garcia E, Restrepo A, McEwen JG. Molecular cloning and characterization of two hsp 70 homologous genes from the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Biomedica.* 2003 Dec;23(4):424-36.
- Forjaz M. Estudo da epidemiologia de paracoccidioidomicose. Rastreamento de áreas endêmicas e de reserva no Brasil. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil, 1989.
- Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1998; 440(3):325-31.
- Franco MD, Nunes J, Lipcey C, Lopez M, Mawas C, Olive D. Regulation of CD2-mediated human T cell activation: anti-CD8 monoclonal antibodies inhibit CD2-mediated rise in intracellular calcium. *Cell Immunol.* 1993; 152(1):162-75.

- Franco M, Sano A, Kera K, Nishimura K, Takeo K, Miyaji M. Chlamyospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1989; 31(3):151-7.
- Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol*. 1987; 25(1):5-18.
- Gibbas C, Jamberck P. *Developing bioinformatics computer skills*. 2001, Lorrie Lejeune.
- Goldman GH, dos Reis Marques E, Duarte Ribeiro DC, de Souza Bernardes LA, Quiapin AC, Vitorelli PM, Savoldi M, Semighini CP, de Oliveira RC, Nunes LR, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Ferreira LE, Moreira JC, Bogossian AP, Tekaia F, Nobrega MP, Nobrega FG, Goldman MH. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryot Cell*. 2003; 2(1):34-48.
- Gonzalez A, de Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect Immun*. 2000; 68(5):2546-52.
- Green ED. Strategies for the systematic sequencing of complex genomes. *Nat Rev Genet*. 2001; 2(8):573-83.
- Green-Willms NS, Butler CA, Dunstan HM, Fox TD. Pet111p, an inner membrane-bound translational activator that limits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial gene COX2. *J Biol Chem*. 2001; 276(9):6392-7. Epub 2000 Dec 5.
- Green-Willms NS, Fox TD, Costanzo MC. Functional interactions between yeast mitochondrial ribosomes and mRNA 5' untranslated leaders. *Mol Cell Biol*. 1998 Apr;18(4):1826-34.
- Grivell LA. Nucleo-mitochondrial interactions in yeast mitochondrial biogenesis. *Eur J Biochem*. 1989; 182(3):477-93.
- Guarro J, GeneJ, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12(3):454-500.
- Heinisch JJ, Valdes E, Alvarez J, Rodicio R. Molecular genetics of ICL2, encoding a non-functional isocitrate lyase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1996; 12(13):1285-95.
- Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;157(1):87-94.
- Hoog C. Isolation of a large number of novel mammalian genes by a differential cDNA library screening strategy. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(22):6123-7.

- Huang X, Madan A. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 1999; 9(9):868-77. *J Bacteriol.* 2000; 182(4):874-81.
- James SL, Glaven J. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J Immunol.* 1989; 143(12):4208-12.
- Jimenez-Finkel BE, Murphy JW. Induction of antigen-specific T suppressor cells by soluble *Paracoccidioides brasiliensis* antigen. *Infect Immun.* 1988; 56(4):734-43.
- Kanehisa M, Bork P. Bioinformatics in the post-sequence era. *Nat Genet.* 2003;33 Suppl:305-10.
- Kellner EM, Orsborn KI, Siegel EM, Mandel MA, Orbach MJ, Galgiani JN. *Coccidioides posadasii* contains a single 1,3-beta-glucan synthase gene that appears to be essential for growth. *Eukaryot Cell.* 2005; 4(1):111-20.
- Kerwin JF Jr, Lancaster JR Jr, Feldman PL. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem.* 1995 27; 38(22):4343-62.
- Kirkness EF, Kerlavage AR. The TIGR human cDNA database. *Methods Mol Biol.* 1997; 69:261-8.
- Kozul R, Malpertuy A, Frangeul L, Bouchier C, Wincker P, Thierry A, Duthoy S, Ferris S, Hennequin C, Dujon B. The complete mitochondrial genome sequence of the pathogenic yeast *Candida (Torulopsis) glabrata*. *FEBS Lett.* 2003; 534(1-3):39-48.
- Kudeken N, Kawakami K, Saito A. Different susceptibilities of yeasts and conidia of *Penicillium marneffei* to nitric oxide (NO)-mediated fungicidal activity of murine macrophages. *Clin Exp Immunol.* 1998; 112(2):287-93.
- Kumar A, Snyder M. Emerging technologies in yeast genomics. *Nat Rev Genet.* 2001; 2(4):302-12.
- Labbe S, Pena MM, Fernandes AR, Thiele DJ. A copper-sensing transcription factor regulates iron uptake genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* 1999; 274(51):36252-60.
- Lacaz, CS, Porto E, Martins JEC. Paracoccidioidomycosis, *Micologia Medica.* 1991; 8 th ed. Editora Savier, São Paulo. p. 248-261. Library screening strategy. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19(22):6123-7.
- Lane TE, Wu-Hsieh BA, Howard DH. Antihistoplasma effect of activated mouse splenic macrophages involves production of reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun.* 1994; 62(5):1940-5.
- Lee SC, Dickson DW, Brosnan CF, Casadevall A. Human astrocytes inhibit *Cryptococcus neoformans* growth by a nitric oxide-mediated mechanism. *J Exp Med.* 1994; 180(1):365-9.

- Lengeler KB, Davidson RC, D'souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P, Pan X, Waugh M, Heitman J. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000; 64(4):746-85.
- Liew FY, Li Y, Millott S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol.* 1990; 145(12):4306-10.
- Litter J, Keszthelyi A, Hamari Z, Pfeiffer I, Kucsera J. Differences in mitochondrial genome organization of *Cryptococcus neoformans* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2005; 88(3-4):249-55.
- Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 1997; 90(5):939-49.
- Londero AT, Ramos TCD. Paracoccidioidomycosis: estudo clínico-micológico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. *J. Pneumol.* 1990; 16: 129-32.
- Loose DS, Stover EP, Restrepo A, Stevens DA, Feldman D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983; 80(24):7659-63.
- Lorenz MC, Bender JA, Fink GR. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot Cell.* 2004 Oct;3(5):1076-87.
- Lorenz MC, Fink GR. Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryot Cell.* 2002; 1(5):657-62.
- Lorenz MC, Fink GR. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature.* 2001; 412(6842):83-6.
- Lu JP, Liu TB, Yu XY, Lin FC. Representative appressorium stage cDNA library of *Magnaporthe grisea*. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2005; 6(2):132-6.
- Luttik MA, Kotter P, Salomons FA, van der Klei IJ, van Dijken JP, Pronk JT. The *Saccharomyces cerevisiae* ICL2 gene encodes a mitochondrial 2-methylisocitrate lyase involved in propionyl-coenzyme A metabolism. *J Bacteriol.* 2000; 182(24):7007-13.
- Magasanik B. Ammonia assimilation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* 2003; 2(5):827-9.
- Mangiaterra ML, Giusiano GE, Alonso JM, Gorodner JO. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in a subtropical region with important environmental changes. *Bull Soc Pathol Exot.* 1999; 92(3):173-6.

- Marques Mello L, Silva-Vergara ML, Rodrigues V Jr. Patients with active infection with *Paracoccidioides brasiliensis* present a Th2 immune response characterized by high Interleukin-4 and Interleukin-5 production. *Hum Immunol.* 2002; 63(2):149-54.
- Martinez R. Paracoccidioidomicose. *Em: micologia médica à luz dos autores contemporâneos* (Sedim & Rocha, eds.), 2004; pp. 204-221, Editora Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro, RJ.
- Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT, Restrepo A, Morais F, Nino-Vega G, Taylor JW. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol.* 2006; 23(1):65-73.
- McCombie WR, Adams MD, Kelley JM, FitzGerald MG, Utterback TR, Khan M, Dubnick M, Kerlavage AR, Venter JC, Fields C. *Caenorhabditis elegans* expressed sequence tags identify gene families and potential disease gene homologues. *Nat Genet.*; 1(2):124-31.
- McDonough JA, Bhattacharjee V, Sadlon T, Hostetter MK. Involvement of *Candida albicans* NADH dehydrogenase complex I in filamentation. *Fungal Genet Biol.* 2002; 36(2):117-27.
- McGinnis S, Madden TL. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32 (Web Server issue):W20-5.
- Montoya AE, Alvarez AL, Moreno MN, Restrepo A, McEwen JG. Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 1999; 37(3):219-22.
- Montoya AE, Moreno MN, Restrepo A, McEwen JG. Electrophoretic karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol.* 1997; 21(2):223-7.
- Morimoto, R.I., Tissieres, A., Georgopoulos, C. (eds) (1994) *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Moscardi-Bacchi M, Soares A, Mendes R, Marques S, Franco M. In situ localization of T lymphocyte subsets in human paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol.* 1989; 27(3):149-58.
- Munoz-Elias EJ, McKinney JD. *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence. *Nat Med.* 2005; 11(6):638-44. Epub 2005 May 15.
- Nino-Vega GA, Buurman ET, Gooday GW, San-Blas G, Gow NA. Molecular cloning and sequencing of a chitin synthase gene (CHS2) of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast.* 1998; 14(2):181-7.

- Nino-Vega GA, Munro CA, San-Blas G, Gooday GW, Gow NA. Differential expression of chitin synthase genes during temperature-induced dimorphic transitions in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2000; 38(1):31-9.
- Nittler MP, Hocking-Murray D, Foo CK, Sil A. Identification of *Histoplasma capsulatum* transcripts induced in response to reactive nitrogen species. *Mol Biol Cell.* 2005; 16(10):4792-813. Epub 2005 Jul 19.
- Norris KA, Schrimpf JE, Flynn JL, Morris SM Jr. Enhancement of macrophage microbicidal activity: supplemental arginine and citrulline augment nitric oxide production in murine peritoneal macrophages and promote intracellular killing of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 1995;63(7):2793-6.
- Nosek J, Fukuhara H. NADH dehydrogenase subunit genes in the mitochondrial DNA of yeasts. *J Bacteriol.* 1994; 176(18):5622-30.
- Ohlrogge J, Benning C. Unraveling plant metabolism by EST analysis. *Curr Opin Plant Biol.* 2000; 3(3):224-8.
- Okubo K, Hori N, Matoba R, Niiyama T, Fukushima A, Kojima Y, Matsubara K. Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. *Nat. Genet.*, 1992, 2, pp. 173–179.
- Ozcan S, Johnston M. Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol Cell Biol.* 1995; 15(3):1564-72.
- Paris S, Duran S. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate (cAMP) and dimorphism in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia.* 1985; 92(2):115-20.
- Pearson WR. Empirical statistical estimates for sequence similarity searches. *J Mol Biol.* 1998 Feb 13;276(1):71-84.
- Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85(8):2444-8.
- Pereira M, Felipe MS, Brigido MM, Soares CM, Azevedo MO. Molecular cloning and characterization of a glucan synthase gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast.* 2000; 16(5):451-62.
- Perez-Martinez X, Bradley SA, Fox TD. Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J.* 2003; 22(21):5951-61.
- Phillips SE, Vincent P, Rizzieri KE, Schaaf G, Bankaitis VA, Gaucher EA. The diverse biological functions of phosphatidylinositol transfer proteins in eukaryotes. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2006; 41(1):21-49.

- Powell BL, Drutz DJ. Identification of a high-affinity binder for estradiol and a low-affinity binder for testosterone in *Coccidioides immitis*. *Infect Immun*. 1984; 45(3):784-6.
- Powrie F, Menon S, Coffman RL. Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. *Eur J Immunol*. 1993; 23(11):3043-9.
- Puig S, Lee J, Lau M, Thiele DJ. Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J Biol Chem*. 2002; 277(29):26021-30. Epub 2002 Apr 30.
- Restrepo A, Espinal LS. Algunas consideraciones ecológicas sobre la paracoccidioidomicosis em Colômbia. *Antioquia médica*. 1968, 18:433-46.
- Restrepo A, McEwen JG, Castaneda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol*. 2001; 39(3):233-41.
- Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*. 1984; 46(2):346–353.
- Restrepo A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. eds. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Ratón, FL: CRC Press, 1994: 121-130.
- Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia*. 1985; 23(5):323-34.
- Restrepo-Moreno A. Paracoccidioidomycosis. In Murphy JW, Friedman H, Bendinelli M, eds. *Fungal Infections and Immune Response*. New York: Plenum Press, 1993: 251-76.
- Ribichich KF, Salem-Izacc SM, Georg RC, Vencio RZ, Navarro LD, Gomes SL. Gene discovery and expression profile analysis through sequencing of expressed sequence tags from different developmental stages of the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *Eukaryot Cell*. 2005; 4(2):455-64.
- Romani L. Cytokine modulation of specific and nonspecific immunity to *Candida albicans*. *Mycoses*. 1999;42 Suppl 2:45-8.
- Rubin-Bejerano I, Fraser I, Grisafi P, Fink GR. Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(19):11007-12. Epub 2003 Sep 4.
- Rude TH, Toffaletti DL, Cox GM, Perfect JR. Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 2002; 70(10):5684-94.

- Sambrook J, Fritsh EF; Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual (2nd Ed.). Cold Spring Harbor, NT: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989.
- San-Blas G, Nino-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol.* 2002; 40(3):225-42.
- San-Blas, G. & Niño-Vega, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: Virulence and Host Response. Em: Cihlar R.L., Calderone R. A., eds. *Fungal Pathogenesis Principles and Clinical Applications.* 2001; pp. 205-226. Marcel Dekker. New York.
- San-Blas G, San-Blas F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. *Mycopathologia.* 1977; 62(2):77-86.
- San-Blas F, San-Blas G, Gil F. Production and regeneration of protoplasts from the Y-phase of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol.* 1994; 32(5):381-8.
- Sano A, Defaveri J, Tanaka R, Yokoyama K, Kurita N, Franco M, Coelho KI, Bagagli E, Montenegro MR, Miyaji M, Nishimura K. Pathogenicities and GP43kDa gene of three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates originated from a nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*). *Mycopathologia.* 1998-99; 144(2):61-5.
- Sauer B. Recycling selectable markers in yeast. *Biotechniques.* 1994;16(6):1086-8.
- Sekiya-Kawasaki M, Abe M, Saka A, Watanabe D, Kono K, Minemura-Asakawa M, Ishihara S, Watanabe T, Ohya Y. Dissection of upstream regulatory components of the Rho1p effector, 1,3-beta-glucan synthase, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2002; 162(2):663-76.
- Shimizu J, Okumura Y, Yoda K, Yamasaki M. A glutamine synthetase mutant of *Saccharomyces cerevisiae* shows defect in cell wall. *J Gen Appl Microbiol.* 1997; 43(3):157-162.
- Scholer A, Schuller HJ. Structure and regulation of the isocitrate lyase gene ICL1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* 1993; 23(5-6):375-81.
- Silva-Vergara ML, Martinez R, Chadu A, Madeira M, Freitas-Silva G, Leite Maffei CM. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol.* 1998; 36(1):37-42.
- Silva-Vergara ML, Martinez R. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 1999; 144 (3): 131-3.
- Sims AH, Gent ME, Robson GD, Dunn-Coleman NS, Oliver SG. Combining transcriptome data with genomic and cDNA sequence alignments to make confident functional assignments for *Aspergillus nidulans* genes. *Mycol Res.* 2004 Aug;108(Pt 8):853-7.

- Soares CM, Madlun EE, da Silva SP, Pereira M, Felipe MS. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(2):505-7.
- Sorais de Landaez F, San-Blas G. Glucan synthetase in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Acta Cient Venez.* 1990;41(4):272-3.
- Sterky F, Lundeberg J. Sequence analysis of genes and genomes. *J Biotechnol.*, 2000; 76(1):1-31.
- Straus AH, Freymuller E, Travassos LR, Takahashi HK. Immunochemical and subcellular localization of the 43 kDa glycoprotein antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* with monoclonal antibodies. *J Med Vet Mycol.* 1996; 34(3):181-6.
- Tabuchi, T. & Uchiyama, H. (1975) Methylcitrate condensing and methylisocitrate cleaving enzymes: evidence for the pathway of oxidation of propionyl-CoA to pyruvate via C7-tricarboxylic acids. *Agric. Biol. Chem.* 39:2035-2042.
- Tavares AH, Silva SS, Bernardes VV, Maranhao AQ, Kyaw CM, Pocas-Fonseca M, Silva-Pereira I. Virulence insights from the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet Mol Res.* 2005;4(2):372-89.
- Toffaletti DL, Del Poeta M, Rude TH, Dietrich F, Perfect JR. Regulation of cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1) expression in *Cryptococcus neoformans* by temperature and host environment. *Microbiology.* 2003 Apr;149(Pt 4):1041-9.
- Trail F, Xu JR, San Miguel P, Halgren RG, Kistler HC. Analysis of expressed sequence tags from *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Fungal Genet Biol.* 2003; 38(2):187-97.
- Tsukihara T, Shimokata K, Katayama Y, Shimada H, Muramoto K, Aoyama H, Mochizuki M, Shinzawa-Itoh K, Yamashita E, Yao M, Ishimura Y, Yoshikawa S. The low-spin heme of cytochrome c oxidase as the driving element of the proton-pumping process. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(26):15304-9. Epub 2003 Dec 12.
- Tullius MV, Harth G, Horwitz MA. Glutamine synthetase GlnA1 is essential for growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human THP-1 macrophages and guinea pigs. *Infect Immun.* 2003; 71(7):3927-36.
- Vallier LG, Coons D, Bisson LF, Carlson M. Altered regulatory responses to glucose are associated with a glucose transport defect in *grr1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 1994; 136(4):1279-85.
- Vicentini AP, Gesztesi JL, Franco MF, de Souza W, de Moraes JZ, Travassos LR, Lopes JD. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun.* 1994; 62(4):1465-9.

- Zhou H, Thiele DJ. Identification of a novel high affinity copper transport complex in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*. 2001; 276(23):20529-35. Epub 2001 Mar 26.
- Zhu H, Nowrousian M, Kupfer D, Colot HV, Berrocal-Tito G, Lai H, Bell-Pedersen D, Roe BA, Loros JJ, Dunlap JC. Analysis of expressed sequence tags from two starvation, time-of-day-specific libraries of *Neurospora crassa* reveals novel clock-controlled genes. *Genetics*.; 157(3):1057-65.
- Wang Z, Szaniszló PJ. WdCHS3, a gene that encodes a class III chitin synthase in *Wangiella* (Exophiala) *dermatitidis*, is expressed differentially under stress conditions. *J Bacteriol*. 2000; 182(4):874-81.
- Wanke B, Londero AT. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. eds. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994: 109-120.
- White S, Larsen B. *Candida albicans* morphogenesis is influenced by estrogen. *Cell Mol Life Sci*. 1997; 53(9):744-9.
- Wolfsberg TG, Landsman D. A comparison of expressed sequence tags (ESTs) to human genomic sequences. *Nucleic Acids Res*. 1997 Apr 15;25(8):1626-32.
- Woo PC, Zhen H, Cai JJ, Yu J, Lau SK, Wang J, Teng JL, Wong SS, Tse RH, Chen R, Yang H, Liu B, Yuen KY. The mitochondrial genome of the thermal dimorphic fungus *Penicillium marneffei* is more closely related to those of molds than yeasts. *FEBS Lett*. 2003; 555(3):469-77.