

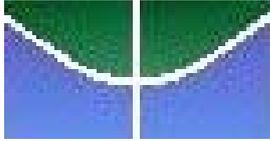
Universidade de Brasília - UnB
Departamento de Biologia Celular
Laboratório de Biologia Molecular
Doutorado em Biologia Molecular

Análise do Transcriptoma e da Expressão
Diferencial de Genes de Micélio e Levedura
de *Paracoccidioides brasiliensis*

Rosângela Vieira de Andrade

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Sueli Soares Felipe

Junho 2006 - Brasília



Universidade de Brasília - UnB
Departamento de Biologia Celular
Laboratório de Biologia Molecular
Doutorado em Biologia Molecular

Análise do Transcriptoma e da Expressão Diferencial de Genes de Micélio e Levedura de *Paracoccidioides brasiliensis*

Rosângela Vieira de Andrade

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Sueli Soares Felipe

**Tese apresentada ao Departamento de
Biologia Celular do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade
de Brasília como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutora em
Biologia Molecular**

Junho 2006 - Brasília

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer a todas as pessoas e instituições que me ajudaram a realizar este trabalho. Em especial a Prof^ª. Dr. Maria Sueli que me ORIENTOU durante todos estes anos. Sueli eu não tenho palavras para dizer tudo o que gostaria!

“Com certeza você vai para o céu”...!!!

Para não ser indelicada ou até mesmo injusta esquecendo alguém, não citarei nomes. Pois se assim o fizesse, precisaria compor uma lista que em número de páginas seria maior que a própria tese...

Sintam-se, no entanto, todos, na medida da sua participação **AGRADECIDOS!!!!!!!!!!**

Meu **MUITO OBRIGADA!**

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - *Paracoccidioides brasiliensis*

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* foi primeiramente isolado e cultivado por Adolfo Lutz em 1908, a partir de amostras colhidas de pacientes na cidade de São Paulo (Lacaz, 1994). Posteriormente, Splendore (1912) estabeleceu as condições de cultivo *in vitro* para este fungo, classificando-o no gênero *Zymonema*, espécie *Zymonema brasiliensis*. Entretanto, somente em 1930 Floriano Paulo de Almeida propôs o gênero *Paracoccidioides* para este fungo, revalidando a classificação proposta por Splendore (1912). Posteriormente, Gueho *et al.* (1997); Peterson & Sigler (1998) e Bailek *et al.* (2000) demonstraram a proximidade filogenética entre o *P. brasiliensis* e os fungos dos gêneros *Histoplasma*, *Emmonsia* e *Blastomyces* utilizando análise de seqüência parcial do RNA ribossomal 26S. Este organismo pertence ao Reino Fungi; Divisão Ascomycota; Subdivisão *Euascomycetes*; Classe *Plectomyceto*; Ordem *Onygenales*; Família *Onygenacea*; Subfamília *Onygenaceae anamórficos*; Gênero *Paracoccidioides*; Espécie *Paracoccidioides brasiliensis*.

Mudanças ambientais, nutricionais e alterações na temperatura podem ser responsáveis pela regulação e/ou participação do processo de dimorfismo em diversos fungos (Sipiczki *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2000). *P. brasiliensis* é um fungo dimórfico, que sofre uma transição da forma miceliana à temperatura de 24-26°C para a forma de levedura a 37°C. Esse processo de interconversão entre estas formas, pode ser controlado *in vitro* por alteração da temperatura de incubação (San Blas, 1993; San Blas *et al.*, 2002), sendo esta definida como uma condição essencial para induzir o dimorfismo (Restrepo & Jimenez, 1980; San Blas & San Blas, 1985). Em meio mínimo, fatores nutricionais como a presença de cisteína (enxofre orgânico) e compostos sulfidrílicos (β -mercaptoetanol) também são importantes durante este processo de transição dimórfica (Medoff *et al.*, 1987). Estas características de *P. brasiliensis* o tornam um excelente modelo para abordagem molecular do processo de diferenciação celular em fungos dimórficos.

1.1.1 - Morfologia

A forma miceliana de *P. brasiliensis* apresenta uma organização pluricelular formada por filamentos de células cilíndricas, com ramificações, denominadas hifas. As hifas são multinucleadas, finas e septadas, podendo ter esporos terminais ou intercalares. As células de levedura são multinucleadas, arredondadas e algumas exibem múltiplos brotamentos, que conferem ao fungo uma estrutura típica usada inclusive para diagnóstico, denominada por Furtado *et al.* (1967) de “roda de leme”. Essas células apresentam um diâmetro de 5 a 25µm e parede celular entre 200 a 600nm de espessura (San Blas, 1985). Por microscopia eletrônica de varredura, os brotamentos são vistos de diferentes formas e tamanhos, mas em geral são esféricos ou levemente alongados. As mudanças morfológicas que acontecem na transformação de levedura para micélio são acompanhadas pela alongação dos brotamentos de levedura, desenvolvendo uma hifa (San Blas, 1985; San Blas & San Blas, 1985; San Blas, *et al.*, 2002).

A diferenciação de micélio para levedura, *in vitro*, se inicia com o aumento no diâmetro e nos espaços intraseptais das hifas. Há o espessamento da parede celular da forma de levedura, as células apresentam brotamentos múltiplos e multiplicam-se rapidamente. Na diferenciação inversa, hifas alongadas são formadas a partir das células ovaladas, principal característica da forma de levedura. Nos dois casos as células não se diferenciam todas ao mesmo tempo, podendo ser encontradas formas de transição juntamente com formas características de micélio ou levedura (San blas, 1985; San blas *et al.*, 2002).

1.1.2 - Aspectos moleculares da membrana e parede celular

A parede celular de *P. brasiliensis* é constituída basicamente por proteínas, lipídeos, quitina e glucanas. Na forma de levedura apresenta maior quantidade de quitina, sendo composta na sua grande maioria por α -1,3 glucana (95%), tendo apenas (5%) de β -1,3 glucana. Já na forma miceliana possui em sua maioria β -1,3 glucana (Kanetsuna *et al.*, 1969). San Blas, em trabalhos publicados em 1993 e 1994, mostrou que a diferença no padrão de síntese de glucanas entre as formas de micélio e levedura deve estar envolvida no processo de diferenciação celular de *P. brasiliensis*. Durante a diferenciação de levedura para micélio, a síntese de α -1,3 glucana é interrompida por um período de 8 horas, sem que haja indício de síntese de β -1,3 glucana e no processo

inverso, ocorre redução da síntese de β -1,3 glucana. Esta síntese e degradação de glucanas durante a diferenciação celular possivelmente permitem a adaptação do fungo às novas condições externas.

A composição de lipídeos de membrana celular também sofre mudanças durante o processo de dimorfismo em *P. brasiliensis*. A forma de levedura possui duas vezes mais lipídeos que a forma miceliana. O ácido linoléico e os lipídeos insaturados são encontrados em maior quantidade na forma miceliana, enquanto na forma de levedura o lipídeo predominante é o ácido oléico (San Blas & San Blas, 1997). Essa diferença possivelmente está relacionada à manutenção da permeabilidade normal da membrana, quando submetida à temperatura de 36°C, necessária para a sobrevivência da forma de levedura sugerindo, desta forma, o provável envolvimento dos ácidos graxos no processo de transição celular desse fungo (Hamdan *et al.*, 1993).

1.1.3 - Genética

A variabilidade genética de *P. brasiliensis* ainda não é totalmente conhecida. Análises por marcadores RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) têm demonstrado fortes evidências de alta variabilidade entre isolados de *P. brasiliensis*, mostrando uma possível correlação com a virulência, distribuição geográfica e resistência a drogas (Soares *et al.*, 1995; Calcagno *et al.*, 1998; Molinari-Madlum *et al.*, 1999; Motta *et al.*, 2002; Hahn *et al.*, 2003).

Soares *et al.* (1995) estudaram o padrão genético de sete isolados, os quais foram separados, de acordo com o coeficiente de similaridade de 35% em dois grupos. Calcagno *et al.* (1998) analisaram 33 isolados de diferentes países, separando-os em 5 grupos, fazendo uma correlação entre o padrão genético e a distribuição geográfica: grupo I composto por isolados oriundos da Venezuela; grupo II do Brasil; grupo III do Peru; grupo IV Colômbia e grupo V da Argentina. Molinari-Madlum *et al.* (1999) relacionaram o padrão genético de 17 isolados com o seu respectivo grau de virulência. Neste contexto, Motta *et al.* (2002) analisaram 35 isolados dos quais 25 apresentaram um padrão com relação ao grau de virulência e o tipo de doença por eles provocada. Hahn *et al.* (2003) com o objetivo de estabelecer possíveis correlações entre parâmetros como: forma clínica da doença, susceptibilidade *in vitro* e *in vivo* a antifúngicos, região e país de isolamento, tipo e local da lesão e o ano de isolamento, estudaram 29 isolados.

Entretanto, nenhuma associação foi encontrada entre o padrão genético destes isolados e os parâmetros investigados.

Outros marcadores também sugerem a presença de diferenças genéticas entre os isolados de *P. brasiliensis*. Salem-Izacc *et al.* (1997) separaram os isolados em três grupos distintos de acordo com seu padrão de síntese protéica. Já Nino-Vega *et al.* (2000) analisaram 32 isolados por RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) e observaram a existência de 5 grupos distintos de acordo com sua distribuição geográfica. Foram descritos por Nascimento *et al.* (2004) 4 microssatélites localizados em regiões codantes e não codantes, entretanto nenhuma correlação foi observada entre estes isolados e a forma da doença provocada (crônica ou aguda).

Recentemente, 65 isolados de *P. brasiliensis* oriundos de diferentes localidades da América Latina foram analisados com bases na seqüência dos genes: quitina sintase – *CHS2* (Nino-Vega *et al.*, 1998); β -glucana sintase - *FKS* (Pereira *et al.*, 2000); α -tubulina e ARF- *adenyl ribosylation factor* (Kasuga *et al.*, 2002) e *PbGP43* (Cisalpino *et al.*, 1996). A reconstrução filogenética, a partir de 65 isolados, indicou a presença de três espécies filogenéticas distintas decorrentes de dois eventos independentes de especiação, correlacionados ao padrão de distribuição dessas potenciais espécies. Os isolados foram divididos em PS1 (38 isolados em uma única espécie), PS2 (espécie filogeneticamente distinta constituída de 5 isolados brasileiros e 1 venezuelano) e PS3 (espécie filogeneticamente distinta contendo 21 isolados colombianos). A presença de recombinação nas regiões gênicas analisadas constituiu uma forte evidência de uma possível reprodução sexuada neste fungo (Matute *et al.*, 2006).

A caracterização do genoma e a determinação do número de cromossomos de *P. brasiliensis* foram determinadas por eletroforese de campo pulsátil – *Pulse Field Electrophoresis* (PFGE) e por microscopia de fluorescência confocal (MFC) (Montoya *et al.*, 1997; Feitosa *et al.*, 2003). O tamanho do genoma, estimado em aproximadamente 30Mb, e os resultados obtidos pela MFC, forneceram evidências de uma natureza haplóide/diplóide ou mesmo aneuplóide de *P. brasiliensis* (Feitosa *et al.* 2003). O seqüenciamento de fragmentos de DNA de cerca de 50 Kb mostrou uma densidade de 1 gene a cada 3,5-4,5 Kb, sugerindo um total de 7.500 a 9.000 genes presentes no genoma do *P. brasiliensis* (Reinoso *et al.*, 2005). O padrão de eletroforese revelou polimorfismo cromossomal, apresentando 4-5 cromossomos, de acordo com o isolado analisado, mostrando tamanhos moleculares variando de 2-10Mb (Montoya *et al.*, 1997; Feitosa *et al.*, 2003).

1.1.4 - Habitat

Mesmo que o habitat natural deste patógeno ainda não tenha sido completamente determinado, acredita-se que este viva como saprófita no solo e/ou em vegetais. Algumas condições ambientais são consideradas favoráveis para o desenvolvimento do *P. brasiliensis*, como temperatura entre 10 e 28°C, índice pluviométrico entre 500 e 2.500 mm/ano, vegetação com florestas abundantes, altitudes entre 47 e 1.300 metros acima do nível do mar, rios de água corrente, estações com invernos curtos, verões chuvosos e solos ácidos (Restrepo, 1985). O homem era considerado único hospedeiro de *P. brasiliensis*, até o reconhecimento de que animais como tatus (*Dasypus novemcinctus*) podem ser naturalmente infectados por esse fungo em regiões endêmicas para esta micose (Naiff *et al.*, 1986; Vergara & Martiniz, 1998-99). Bagagli *et al.* (1998) confirmaram esses dados, demonstrando que o mesmo representa um reservatório natural e possivelmente um hospedeiro silvestre para esse fungo. *P. brasiliensis* já foi também isolado em outros animais como, por exemplo, fezes de morcegos frutíferos, biópsia de um macaco (Restrepo, 1994) e em cães (Ricci *et al.*, 2004). Entretanto, nenhuma conclusão pode ser inferida a respeito desses e de outros casos isolados, uma vez que são poucos os relatos da presença do parasita nesses hospedeiros e a relevância desses achados na epidemiologia da doença ainda não foi completamente elucidada (Restrepo *et al.*, 2001). Supõe-se que o parasita seja transmitido do solo, nas formas infectantes, clamidósporos e/ou conídeos, provenientes da forma miceliana, para o organismo humano, via aerógena, ou ainda, através de pequenas escoriações na pele (McEwen *et al.*, 1987; Restrepo *et al.*, 2001).

1.2 - Paracoccidioidomicose (PCM)

1.2.1 - Aspectos epidemiológicos

P. brasiliensis é o agente etiológico de uma das mais importantes micoses sistêmicas do Brasil, a paracoccidioidomicose também denominada blastomicose sul-americana ou blastomicose brasileira. A PCM é uma micose endêmica que possui uma distribuição geográfica não uniforme na América Latina (Restrepo, 1994; Manns *et al.*, 1996), estendendo-se do México até a Argentina (Restrepo, 1985), não havendo registros desta doença em países como Nicarágua, Guiana, Chile e Suriname (Restrepo

et al., 2001). O Brasil é o país que apresenta o maior número de pacientes notificados, com 80% dos casos, sendo as áreas afetadas observadas em São Paulo, Góias, Minas Gerais e Mato Grosso (Coutinho *et al.*, 2002). McEwen *et al.* (1995) relataram a ocorrência de 10 milhões de indivíduos infectados na América Latina, sendo que somente 2% desenvolvem a doença. Em áreas classificadas como altamente endêmicas, a razão de incidência anual da PCM é estimada em 3/100.000 habitantes (Restrepo *et al.*, 2001). Nestas áreas os casos de letalidade aparecem com uma frequência considerável (2 a 23%) e, quando associados a portadores do vírus HIV (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) podem atingir até 30% dos pacientes (Marques *et al.*, 2000). No entanto, a determinação do local de aquisição da PCM, sua real distribuição e seu diagnóstico são comprometidos devido ao fato de ser uma infecção de longo período de latência (média de 15,3 anos) e de notificação não obrigatória (Brummer *et al.*, 1993).

A doença é mais frequente em indivíduos do sexo masculino (80 a 90%) com idade entre 30 e 60 anos, afetando principalmente trabalhadores do meio rural e indivíduos imunodeprimidos. Em indivíduos do sexo feminino (idade reprodutiva) e em crianças, a incidência da PCM é menor, chegando a uma taxa homem: mulher de 78:1 casos (Restrepo *et al.*, 1984 e 1997). Provavelmente esta diferença seja decorrente de variações no perfil hormonal homem/mulher (Loose *et al.*, 1983). Esta hipótese pode ser justificada pelo fato de que durante o período da puberdade a doença se desenvolve da mesma forma em ambos os sexos. Neste contexto, Restrepo *et al.* (1984) mostraram que o hormônio feminino β -estradiol inibe a transição de micélio para levedura *in vitro*, sugerindo um papel protetor desse hormônio. Aristizabal *et al.* (1998 e 2002) infectaram camundongos machos e fêmeas com *P. brasiliensis* e mostraram que em camundongos fêmeas e em machos castrados tratados com β -estradiol a transição de micélio para levedura não ocorria. Estes resultados reforçam o papel do estradiol na resistência das fêmeas a infecção.

1.2.2 - Aspectos clínicos

A PCM apresenta diversas formas clínicas que variam em diferentes indivíduos, dependendo tanto de aspectos específicos do parasita como do hospedeiro. As formas infectantes afetam inicialmente os pulmões do hospedeiro, sendo, posteriormente convertidas em leveduras, o que torna o processo de diferenciação uma etapa

fundamental para o estabelecimento da infecção (Restrepo, 1985; San Blas, 1993; San Blas *et al.*, 2002).

A doença pode se apresentar sob duas formas básicas: aguda e crônica. A primeira acomete ambos os sexos, geralmente pacientes jovens, e origina-se a partir de uma lesão primária não detectada que progride rapidamente com disseminação para o baço, fígado, linfonodos e medula óssea. A forma crônica tem sua origem em um foco primário ou em uma lesão antiga, contendo formas viáveis de *P. brasiliensis*, podendo estar restrita a um órgão, sistema ou podendo ainda atingir múltiplos órgãos, como intestinos, ossos e o sistema nervoso central (Franco, 1987; Tristano *et al.*, 2004).

O estabelecimento do fungo no tecido pulmonar induz uma resposta inflamatória que leva a formação do granuloma, que é definido como uma coleção compacta de células do sistema fagocitário mononuclear, podendo sofrer transformação para células epitelióides e gigantes. O macrófago é a principal célula integrante do granuloma, apresentando atividades microbidas e de apresentador de antígeno, além de, juntamente com linfócitos T, produzir as citocinas. O granuloma é a lesão fundamental na PCM e como em outras doenças infecciosas (tuberculose, hanseníase, histoplasmose) é o resultado de uma reação de hipersensibilidade tardia (DTH) contra antígenos do agente infeccioso (De Brito & Franco, 1994). O desenvolvimento do granuloma permite a contenção do patógeno, impedindo sua disseminação pelo organismo (Romani, 1997).

Investigações experimentais e observações clínicas têm indicado um papel relevante da resposta imune celular (tipo 1) ou humoral (tipo 2) na patogenia e evolução da PCM (Castaneda *et al.*, 1998). A utilização de modelo murino experimental e a caracterização de linhagens resistentes e suscetíveis (Calich *et al.*, 1985) vêm permitindo um maior entendimento da resposta protetora do hospedeiro contra a PCM. Em camundongos resistentes, verificou-se uma infecção caracterizada pela ativação de macrófagos e neutrófilos e baixos níveis de anticorpos específicos para *P. brasiliensis*. Além disso, esses animais apresentaram uma produção inicial de altos níveis de IFN- γ e pequena quantidade de citocinas do tipo 2 (IL-4, IL-5 e IL-10). Já em camundongos suscetíveis foram detectados níveis mínimos e transitórios de IFN- γ e produção relativamente alta de IL-5 e IL-10. A citocina IL-4 foi detectada apenas de forma transitória na fase mais tardia da infecção, o que dificulta afirmar que a suscetibilidade esteja exclusivamente ligada ao desencadeamento de uma resposta imunológica tipicamente do tipo 2 (Calich & Kashino, 1998; Kashino *et al.*, 2000).

Na PCM humana foi observado um padrão de produção de citocinas e resistência similar aquele verificado em infecção experimental de camundongo. Pacientes tanto com a forma crônica como a forma aguda, bem como indivíduos sadios sensibilizados para *P. brasiliensis*, foram avaliados quanto ao padrão de síntese de citocinas. Os indivíduos sadios demonstraram uma produção substancial de IL-2, IFN- γ e IL-10, enquanto que os pacientes apresentaram baixos níveis de IL-2 e IFN- γ e níveis elevados de IL-10 (Benard *et al.*, 2001). Fornari *et al.* (2001) verificaram que soro de pacientes com a doença disseminada apresentava altos níveis de IL-10, TNF- α e IL-2 e pequena produção de IFN- γ . Esses e outros estudos sugerem que a resposta imunológica celular caracterizada pela produção de citocinas do tipo 1 (IFN- γ , IL-12) parece fazer parte do principal mecanismo de defesa contra *P. brasiliensis* (Cano *et al.*, 1998; Souto *et al.*, 2000; Arruda *et al.*, 2002). Neste contexto, a resistência e as várias formas da doença, além de estarem associadas com o decréscimo da resposta imune celular, estão também relacionadas com o aumento dos níveis de IgG. (Mota *et al.*, 1988; Vaz *et al.*, 1992). A glicoproteína GP43 é o maior antígeno secretado pelo *P. brasiliensis* (Cisalpino *et al.*, 1996) estando envolvida em mecanismos que propiciam uma baixa atividade fagocitária e microbicida das células do hospedeiro contra este fungo (Popi *et al.*, 2002). Uma outra glicoproteína, a gp70, também foi relatada como estando envolvida na baixa atividade fagocitária dos macrófagos peritoneais de camundongo, evitando a formação de granulomas no pulmão, o que sugere que estas glicoproteínas estejam envolvidas no estabelecimento e progressão das lesões observadas no processo de infecção primária de *P. brasiliensis* (Grosso *et al.*, 2003).

1.2.3 - Diagnóstico e tratamento

Os métodos de diagnóstico mais utilizados para a PCM são baseados na identificação direta do fungo no material retirado das lesões e seu posterior isolamento. Além disso, a identificação de anticorpos anti-gp43 também é usado para o diagnóstico desta micose. No entanto, possíveis limitações podem ser detectadas nestes testes, pois os níveis destes anticorpos podem ser baixos em pacientes imunocomprometidos, além do diagnóstico imunológico poder apresentar reações cruzadas com proteínas de outros fungos (San Blas *et al.*, 2002). Para tentar amenizar este problema, Díez *et al.* (2003) descreveram testes de diagnóstico utilizando a mistura de dois antígenos identificados

em *P. brasiliensis*: Hsp87 purificada e uma proteína recombinante de 27 kDa, originalmente descrita por McEwen *et al.*, 1996. O uso da combinação destes dois antígenos em testes de ELISA mostrou um aumento da sensibilidade e da especificidade no diagnóstico da PCM.

Diagnóstico utilizando a técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) vem sendo proposto mais recentemente. Goldani e Sugar (1998) utilizaram esta técnica para detectar a presença de *P. brasiliensis* no sangue de camundongos infectados. Motoyama *et al.*, (2000) demonstraram a utilização da PCR para diferenciar *P. brasiliensis* de outros fungos patogênicos ao homem, empregando oligonucleotídeos específicos para as regiões do rDNA 5.8S e 28S. Além destes trabalhos, outros utilizando a glicoproteína gp43 têm sido desenvolvidos na tentativa de padronizar a utilização da PCR como diagnóstico para a PCM (Morais *et al.*, 2000; Bailek *et al.*, 2000; Semighini *et al.*, 2002). Bernardes (2005) desenvolveu um teste por PCR para detecção de *P. brasiliensis* em amostras de sangue e lavado broncoalveolar de paciente. Foram testados 19 isolados de *P. brasiliensis*, bem como o DNA de outros fungos relacionados, através da especificidade dos oligonucleotídeos complementares ao gene *PbM51* (Venâncio *et al.*, 2002). Neste mesmo contexto, San-Blas *et al.* (2005) desenvolveram oligonucleotídeos que amplificam um fragmento de 0.72 kb para detecção de *P. brasiliensis* em amostras clínicas proveniente de escarro e fluido cérebro-espinhal (CSF) de pacientes com PCM. Estes métodos demonstraram uma elevada sensibilidade e especificidade para detecção de *P. brasiliensis* nestas amostras.

O tratamento da doença é normalmente prolongado, podendo durar até cinco anos. Atualmente é feito à base de sulfas e/ou de drogas antifúngicas, seguidas de acompanhamento pós-terapêutico. As drogas frequentemente utilizadas são: Itraconazol, Cetoconazol, Sulfametoxazol, Trimetoprim e Anfotericina B, que apresentam eficiência significativa, mas com severos efeitos colaterais. Novos estudos estão sendo realizados visando formas alternativas de tratamento para a PCM e mecanismos que induzam respostas imunológicas mais eficazes, como o desenvolvimento de vacinas. Taborda *et al.* (1998) identificaram um epítipo da gp43 capaz de desencadear uma resposta imune protetora em camundongos. Pinto *et al.* (2000) conseguiram demonstrar um efeito protetor de um pro-peptídeo de 15 resíduos de aminoácidos, derivado da gp43, denominado P10. Com intuito de melhorar a distribuição do peptídeo P10, foi sintetizado um peptídeo análogo denominado M10, o qual também protegeu camundongos infectados. Estes peptídeos podem vir a ser usados como uma vacina de

DNA (Taborda *et al.*, 2004). Assim como a gp43, outros genes são candidatos ao desenvolvimento de vacinas, como os antígenos F0 e FII, recentemente descritos (Diniz *et al.*, 2004).

1.3 – Avanços Recentes em Biologia Molecular

O desenvolvimento do Projeto Genoma Humano (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001) propiciou um grande avanço no conhecimento da área de Biologia Molecular e como consequência vários outros projetos genoma foram desenvolvidos nos últimos anos, em animais, vegetais e microrganismos. Estes projetos propiciaram o desenvolvimento de novas ferramentas para o estudo de seqüências gênicas e de proteínas, gerando um grande volume de informações sobre suas estruturas, o que permitiu um maior conhecimento dos processos metabólicos, doenças hereditárias, interação patógeno-hospedeiro, entre outros.

A Computação teve fundamental importância nestes projetos, o que fez surgir uma nova área denominada de Bioinformática (Brown & Botstein, 1999; Baxevanis & Quellerie, 2001; Green 2001; Gibas & Jambeck, 2001), que ainda encontra-se em pleno desenvolvimento. Particularmente, a Bioinformática tem gerado o desenvolvimento de novos algoritmos, bancos de dados e computação distribuída. Entre os centros importantes de seqüenciamento de genomas no mundo, destacam-se TIGR-*The Institute for Genome Research*, SANGER CENTER, DOE (*Department of Energy*) - *Joint Genome Institute*, Universidade de Washington em St. Louis e ONSA - *Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis* (Brasil).

1.3.1 - Genoma, Transcriptoma, Proteoma e Metaboloma

A genômica é caracterizada pela identificação, caracterização completa dos genes e pelo seqüenciamento em larga escala, possibilitando assim, a inferência de funções gênicas pela comparação com genes homólogos de funções conhecidas, depositadas em bancos de dados públicos (Dunham *et al.*, 2000; Notebaart *et al.*, 2005). Os projetos de seqüenciamento de genoma seguem duas estratégias: genômica estrutural e genômica funcional. Um projeto de genoma estrutural consiste no seqüenciamento de fragmentos de DNA genômico, gerando informações de regiões gênicas e intergênicas. Já o genoma funcional ou transcriptoma consiste no seqüenciamento de transcritos

gênicos, tendo como principal objetivo o estudo da expressão gênica em larga escala. A metodologia mais utilizada para esta análise baseia-se no isolamento e retro-transcrição de RNAs mensageiros, onde a seqüência gerada de cada extremidade 5' e/ou 3' é denominada EST (*Expressed Sequence Tags*) (Adams *et al.*, 1991), podendo também ser geradas ESTs internas ao cDNA, denominadas ORESTES (*Open Reading Frames EST Sequence*). Desta forma, por meio da análise do transcriptoma, pode-se determinar em que momento um dado gene é ativado ou inibido. Assim, comparar transcriptomas permite entender como as mudanças na atividade celular podem refletir ou contribuir para uma determinada doença. Um dos projetos pioneiros foi o de análise do transcriptoma de camundongo, que gerou cerca de 60.770 seqüências de cDNA completos, contribuindo significativamente com o número de seqüências depositadas em bancos de dados (Okazaki, 2002).

A lista de genomas completamente seqüenciados vem crescendo com uma velocidade cada vez maior, fato este importante para o enriquecimento dos bancos de dados de acesso público. Atualmente existem 1.653 projetos genomas em desenvolvimento, sendo 804 de organismos procariotos e 549 de eucariotos. Destes projetos, foram inteiramente seqüenciados 317 genomas. Especificamente em fungos, existem 139 projetos de seqüenciamento de genomas (118 estruturais e 22 funcionais). Dentre desses projetos Genoma estão incluídos os de fungos patogênicos humanos: *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis* e *Paracoccidioides brasiliensis*. Até o momento, somente 6 genomas estruturais foram concluídos: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium (Gibberella graminearum)*, *Magnaporthe grisea* e *Ustilago maydis* (GOLD - *Genomes OnLine Database*, maio 2006).

Os dados gerados pela genômica estrutural e funcional nos últimos anos, têm possibilitado o surgimento da genômica comparativa, uma importante área dentro da bioinformática, na qual são pesquisados novos métodos de comparações em larga escala de seqüências genômicas, expressas e não-expressas, entre diferentes organismos. Esta estratégia permite investigar a funcionalidade comum de organismos próximos filogeneticamente e obter um conhecimento mais profundo de como genes ou grupos de genes estão envolvidos em determinadas funções e características (Telles *et al.*, 2005).

A genômica no Brasil tem se destacado e contribuído para gerar dados e fornecer novas metodologias tanto na área agropecuária como na saúde humana. Importantes redes de seqüenciamento foram criadas como, por exemplo, a rede responsável pelo

Projeto Genoma Brasileiro (*Chromobacterium violaceum*) bem como as Redes Genomas Regionais, as quais possibilitaram o desenvolvimento de vários projetos de relevância científica e tecnológica. No estado de São Paulo os seguintes projetos foram desenvolvidos: *Xylella fastidiosa*, Genoma do Câncer Humano, Cana-de-Açúcar, *Xylella fastidiosa* de videira, *Xanthomonas axonopodis* e a *campestre*, *Leifsonia xyli* e o Projeto Genoma do café, além de subsidiar o Projeto Genoma de ESTs de *Schistosoma mansoni* desenvolvido juntamente com a Rede Genoma do Estado de Minas Gerais, a Rede Genoma do Estado da Bahia, responsável pelo genoma funcional do *Crinipellis perniciosus*; a Rede Nordeste responsável pelo genoma funcional da *Leishmania chagasi*; a Rede Genoma do Consórcio do Instituto de Biologia Molecular do Paraná, FIOCRUZ e Universidade de Mogi das Cruzes, responsável pelo genoma funcional do *Trypanosoma cruzi*; a Rede do Rio de Janeiro responsável pelo estudo do genoma da *Gluconacetobacter diazotrophicus*; a Rede do Paraná responsável pelo genoma da *Herbaspirillum seropedicae*; a Rede Sul de Análise de Genomas e Biologia Estrutural responsável pelo seqüenciamento do genoma de *Mycoplasma hyopneumoniae* e a Rede Genoma Centro-Oeste responsável pelo genoma funcional do *Paracoccidioides brasiliensis*.

Apesar do grande avanço gerado pela genômica estrutural e/ou funcional, informações adicionais e complementares para o total entendimento da expressão de um determinado gene pode necessitar de novas informações geradas por análises de proteoma. Assim novas abordagens foram propostas visando complementar as informações geradas por estes projetos. Estas novas áreas de conhecimento foram denominadas proteômica e metabolômica (Fig. 1).

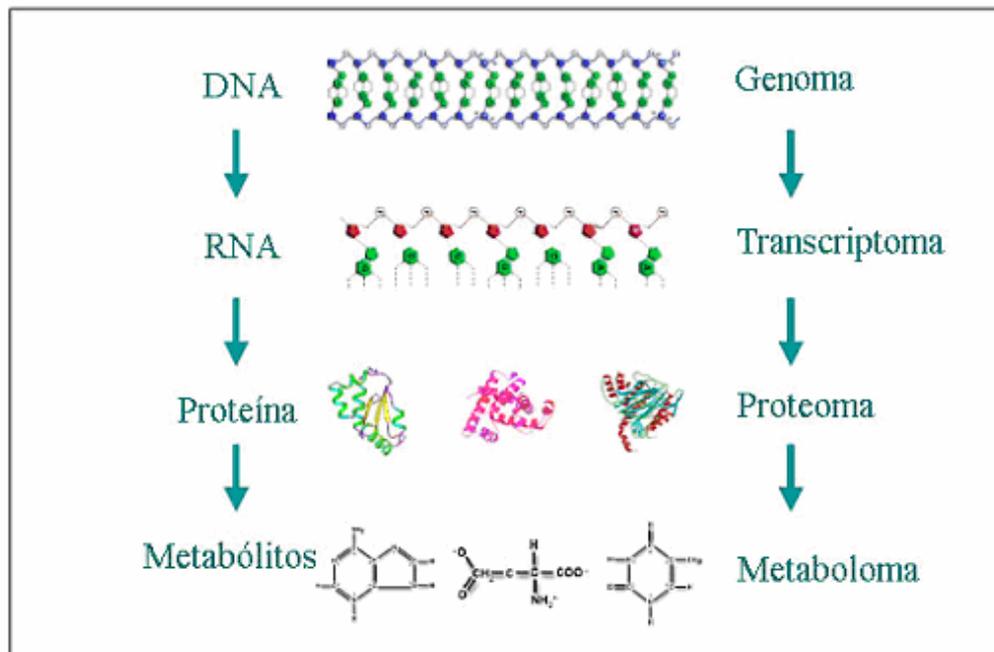


Figura 1. Avanços na área de Biologia Molecular. Diferentes áreas envolvidas na caracterização gênica de um organismo (Beecher, 2002).

O proteoma descreve um conjunto completo de proteínas resultantes da expressão gênica, sendo gerado com base em um mapa usando eletroforese em gel de poliacrilamida bi-dimensional (2D). O crescente interesse em proteômica vem acelerando o desenvolvimento e a implementação de estratégias mais apropriadas para a análise de expressão e função de proteínas em larga escala. Avanços relativamente recentes na caracterização de proteínas têm surgido da automatização de métodos como *matrix-assisted laser desorption-ionization* (MALDI) e *eletrospray ionization* (ESI) *mass spectrometry* (MS) para obter o perfil de massa e seqüenciamento de peptídeos (Graves & Haystead, 2002).

Os organismos sintetizam milhares de proteínas ao mesmo tempo, e a diversidade potencial de tipos de proteínas no proteoma certamente excede o número estimado de genes do genoma. Isto ocorre porque os produtos de um gene podem diferir devido a uma variedade de modificações pós-transcricionais e pós-traducionais possíveis (Von Mering *et al.*, 2002; Pandey & Mann, 2000). Como a proteômica depende da extração, separação, visualização, identificação e quantificação das proteínas presentes em um organismo ou tecido, em um determinado momento e,

devido a grande complexidade e limitações de se estudar um proteoma, atualmente nenhum proteoma encontra-se completamente descrito.

A metabolômica é um ramo da ciência que tem como finalidade estudar o conjunto de proteínas produzidas pelos diversos tipos celulares em diferentes condições, predizendo o estado metabólico de um determinado sistema biológico (Romero *et al.*, 2005). As inferências das vias metabólicas elucidam o principal papel dos genes em seu contexto biológico, constituindo-se em um primeiro passo para uma modelagem quantitativa do metabolismo (Rochfort, 2005). O estudo do metaboloma é considerado uma ferramenta sensível para indicar quaisquer mudanças nos sistemas biológicos naturais (Fiehn, 2002; Weckwerth, 2003). Ferramentas de bioinformática são necessárias e já estão sendo desenvolvidas para organizar e facilitar a visualização dos dados dos metabolomas de modo a auxiliar na sua interpretação, o que permitirá integrar e correlacionar o metabolismo e expressão gênica (Cho *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2005). Neste contexto, a metabolômica ajudará na revelação de como os genótipos estão associados com os fenótipos, e permitirá fazer simulações computacionais de mecanismos celulares em larga escala. Isto requer uma organização de descobertas biológicas, quantificação e identificação de todos os metabólitos em um complexo de amostras biológicas de forma rápida e simultânea.

Embora pesquisas abordando genomas, transcriptomas, proteomas e metabolomas tenham evoluído bastante, ainda fornecem somente uma análise parcial. Estas abordagens normalmente comparam um ou mais estados biológicos para determinar onde as mudanças ocorreram. Neste sentido as estratégias “ômicas” geram hipóteses, e apresentam um ponto de partida para investigações que devem ser validadas pelos experimentos científicos clássicos (Rochfort, 2005).

1.3.2 - Análise da expressão gênica diferencial

O desenvolvimento e a diferenciação celular nos organismos eucarióticos são caracterizados pela expressão gênica diferencial regulada tanto temporalmente quanto espacialmente. A regulação da expressão de genes em nível transcricional envolve a participação de fatores de transcrição específicos que reconhecem elementos de seqüências situados nos promotores denominados de elementos regulatórios, os reforçadores ou os silenciadores (*enhancers* ou *silencers*). Desta forma, a regulação transcricional exata e em momento específico da célula é crítica para a sobrevivência

celular (Jacquemin *et al.*, 1998; Gregory *et al.*, 2001). A regulação transcricional é central no estabelecimento de vários processos biológicos tais como o crescimento celular, as alterações no metabolismo geral em resposta a mudanças ambientais ou o desenvolvimento de organismos multicelulares tanto em condições normais como patológicas.

A identificação de um conjunto de genes diferencialmente expressos em uma célula, tecido ou organismo, numa determinada condição, em relação a um conjunto de genes expressos em outra situação a ser comparada, permite a compreensão dos genes responsáveis pela manifestação do fenótipo diferencial. Entretanto, em geral esta é uma análise extremamente difícil devido à complexidade de RNAs transcritos pela célula e pela existência de grande variação entre os níveis de expressão de diferentes transcritos. Além disso, para muitos genes, a diferença no nível de expressão entre as condições que se quer comparar pode ser muito pequena, dificultando ainda mais a identificação (Lynch, 2006). Esta pequena variação pode ser responsável por uma alteração biológica significativa, o que justifica a busca por estratégias metodológicas que possam identificar estas alterações do padrão de expressão gênica.

A análise espacial e temporal da transcrição é um aspecto preliminar importante na genômica funcional. A comparação entre perfis transcricionais contrastantes (genótipo ou condições fisiológicas diversas) pode auxiliar na identificação dos genes responsáveis pelo processo biológico em estudo.

1.3.2.1 - Métodos utilizados para análise da expressão gênica diferencial

O acúmulo de seqüências gênicas depositadas em bancos de dados públicos mundiais tem aumentado consideravelmente a demanda por metodologias que permitam avanços no estudo de suas funções, além de elucidar os padrões de expressão em condições biológicas específicas. As análises convencionais de expressão de genes individuais, apesar de precisas, não apresentam a eficiência e a rapidez necessária para acompanhar o ritmo de seqüenciamento em larga escala e a descoberta de novos genes. Abordagens mais rápidas de análise da expressão gênica diferencial tornaram-se necessárias na identificação e no estudo simultâneo de um grande número de genes envolvidos em diversos processos biológicos (Donson *et al.*, 2002).

Neste contexto, diversas técnicas vêm sendo desenvolvidas para identificar genes diferencialmente expressos. Entre estas metodologias, podemos citar as técnicas de DDRT-PCR, SAGE, SSH, RDA, Subtração *in silico* e Arranjos de DNA.

DDRT-PCR

A DDRT-PCR (*Differential Display Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*), desenvolvida por Liang & Pardee (1992), é uma técnica realizada em duas etapas. A primeira consiste de uma reação de transcrição reversa das populações de mRNA a serem analisadas, usando um oligo-dT ancorado em uma ou duas bases em sua extremidade 3', que anela na cauda poli (A) de uma das subpopulações de mRNA. A segunda etapa é a amplificação dos cDNAs obtidos por meio de PCR usando oligonucleotídeos o mesmo oligo-dT da primeira reação e um outro oligonucleotídeo de sequência arbitrária (AP). Em seguida, os fragmentos de cDNA radioativos, marcados com α -³³P dNTP durante a PCR, são separados em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, momento em que é feita a comparação entre os fragmentos de cDNA das diferentes preparações de RNA obtidas a partir das diferentes condições biológicas em estudo (Liang *et al.*, 1993).

O uso de oligo-dT ancorado por uma ou duas bases permite a análise das diferentes subpopulações de RNA mensageiro total de uma célula. Utilizando o oligo-dT ancorado em uma base é possível teoricamente analisar a expressão de 1/3 da população de mRNA, enquanto com o uso do oligo-dT ancorado por duas bases, 1/12 dos mRNA da célula poderão ser analisados. Em teoria, o uso dos 12 oligos-dT ancorados em conjunto com 20 oligos arbitrários, inicialmente descritos por Ling e Pardee em 1992, seriam suficientes para produzir fragmentos de cDNA representando aproximadamente 15.000 genes expressos. Bauer *et al.* (1993) desenharam 26 novos oligos AP e sugeriram que o uso de pelo menos 25 destes oligos seriam necessários para cobrir uma população total de mRNA representada por uma célula eucariótica.

A técnica de DDRT-PCR tem sido aplicada para investigar os mecanismos moleculares envolvidos em diversos processos biológicos em eucariotos, como por exemplo, na diferenciação celular, nas vias de transdução sinal (Cataldo *et al.*, 1999; Rhodes *et al.*, 2001), no estudo de resistência a drogas (Schneider & Zelck, 2001) e em virulência (Rindi *et al.*, 1999). Em fungos dimórficos e patogênicos para o homem, como *C. albicans* (Cognetti *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2003), *H. capsulatum* (Colonna-Romano *et al.*, 1998) e *P. brasiliensis* (Venâncio *et al.*, 2002) esta técnica tem sido

empregada para isolar genes diferencialmente expressos durante a transição morfológica e sob diferentes condições de cultivo.

As principais vantagens da técnica de DDRT-PCR quando comparada a outras metodologias são: (i) o uso de pequenas quantidades de RNA total; (ii) as reações não precisam ser feitas usando RNA poli (A+), evitando desta forma a etapa de purificação e seus custos e riscos e, (iii) a simplicidade e rapidez das reações, possibilitando comparar diversas células submetidas a diferentes estímulos e condições simultaneamente (Liang *et al.*, 1993). Apesar da DDRT-PCR ser uma técnica eficiente na identificação de genes de expressão diferencial, algumas desvantagens podem ser observadas como: esta técnica não é um método quantitativo, não é utilizada em larga escala e uma grande frequência de falsos positivos pode ser observada. Além disto, os fragmentos de cDNA amplificados são geralmente de tamanho pequeno (100-300pb) e normalmente correspondem à região 3' não traduzida (UTR) do gene, fornecendo pouca informação para a identificação de genes diferencialmente expressos (Wan *et al.*, 1996).

SAGE

A tecnologia SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) foi desenvolvida por Velculescu *et al.* (1995). Nesta tecnologia os RNAs mensageiros são isolados utilizando métodos convencionais e, os cDNAs são sintetizados após hibridização com oligo-dT biotinilado (ou ligado covalentemente a *beads* magnético) e digeridos com uma enzima de restrição que reconhece 4 pb. Os fragmentos correspondentes a porção 3' dos mensageiros são capturados por estreptavidina ligada a *beads* e seletivamente purificados. Após divisão dessa reação em 2 *pools*, é feita a ligação de 2 diferentes adaptadores (cada um em um dos *pools* separados acima). Após a ligação, é feita a clivagem empregando uma enzima de restrição, cujo sítio encontra-se nos adaptadores. Os 2 *pools* são novamente reunidos, ligados, amplificados e novamente digeridos com enzima de restrição. Em seguida, os *ditags* são ligados (concatenados), clonados e seqüenciados. Desta forma, cada mensageiro gera uma única seqüência constituída de 9-10 bases (*tags*). Em seguida, uma contagem em larga escala das seqüências obtidas de uma população de transcritos é feita. Comparando-se a frequência de aparecimento de cada *tag*, observada entre diferentes condições de expressão gênica, os genes diferencialmente expressos podem ser inferidos.

Esta metodologia foi usada para determinar a expressão diferencial de genes em células humanas normais e cancerosas (Aung *et al.*, 2005; Oue *et al.*, 2005) e na

identificação de genes diferencialmente expressos em tecidos específicos ou em condições fisiológicas diversas (Matsumura *et al.*, 1999; Steen *et al.*, 2003). A caracterização do transcriptoma da *S. cerevisiae* foi realizada usando esta metodologia. Neste caso, foram analisados 60.633 transcritos, dos quais 4.665 genes revelaram níveis de expressão diferencial em diferentes fases do ciclo celular. Destes genes, 1.981 apresentaram uma função conhecida, enquanto 2.684 foram considerados genes novos não relatados previamente. Entre os genes altamente expressos, a maioria estava envolvida com o metabolismo energético e como a síntese protéica (Velculescu *et al.*, 1997).

Dentre os métodos que avaliam a expressão gênica de uma amostra, as vantagens do SAGE são: permitir uma análise quantitativa e simultânea de um grande número de transcritos; e o seqüenciamento de fragmentos curtos, reduzindo o custo do seqüenciamento. Entretanto, é necessário um seqüenciamento automatizado em grande escala para encontrar seqüências pouco expressas. Além disto, foi verificado que os fragmentos curtos podem não identificar unicamente um gene (Boon *et al.*, 2002).

Hibridação Subtrativa

Técnicas baseadas em hibridação como SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*) e RDA (*Representational Difference Analysis*) também são utilizadas para comparar 2 populações de cDNA e selecionar genes diferencialmente expressos. No SSH, desenvolvida por Diatchenko *et al.* (1995), cDNAs são sintetizados a partir de 2 populações diferentes de transcritos. A população de cDNA contendo os transcritos a serem analisados é denominada *tester* e a população de cDNA referente (controle) é denominada *driver*. As amostras de cDNA *tester* são ligadas a adaptadores em sua porção 5', desnaturadas e renaturadas na presença de excesso de cDNA *driver*. Na etapa seguinte, os híbridos diferencialmente expressos contendo adaptadores nas duas extremidades são seletivamente amplificados por PCR. Os cDNAs obtidos são então clonados, gerando uma biblioteca enriquecida de genes diferencialmente expressos. No RDA o mesmo princípio é empregado. Entretanto, a hibridação pode ser feita diversas vezes, gerando bibliotecas altamente enriquecidas.

Um exemplo da aplicação desta metodologia pode ser visto em Braum *et al.*, (2000), onde foram identificados genes que são reprimidos por TUP1, um repressor transcricional relacionado à diferenciação celular em *C. albicans*. Neste trabalho foi feita uma hibridação subtrativa entre o cDNA de um isolado controle (*C. albicans*

selvagem) e um isolado com o gene *tup1* deletado. Foram identificados 7 genes reprimidos por TUP1 e 5 genes induzidos durante a transição de levedura para micélio. Tian & Shearer (2001) usaram hibridação subtrativa para isolar 16 genes de *H. capsulatum* mais expressos em micélio do que em levedura, sendo que 2 destes genes foram totalmente seqüenciados e caracterizados.

Esta técnica permite a comparação entre duas populações de cDNA isoladas em condições distintas (Wan *et al.*, 1996; Braun *et al.*, 2000). Contudo, o processo de hibridação subtrativa seguida de PCR pode levar à amplificação de segmentos de DNA que não são diferencialmente expressos, por eventual falha no processo de subtração.

Subtração *in silico*

A subtração *in silico* consiste na seleção de genes diferencialmente expressos utilizando técnicas estatísticas e computacionais. Nesta metodologia, um conjunto de genes oriundos de bibliotecas distintas de cDNA são comparados, para investigar sua expressão diferencial, utilizando técnicas de bioinformática. Considerando que a frequência do aparecimento de uma determinada seqüência em particular é correspondente à frequência da sua presença no banco de cDNA e, conseqüentemente na população de mRNA usada para a construção deste banco, a análise desta frequência pode indicar a expressão diferencial de um gene. Esta técnica foi usada por Wan *et al.* (1996), os quais construíram duas bibliotecas de cDNA a partir de células HeLa tratadas e não tratadas com IFN- γ por 48 horas. Os resultados, obtidos pela análise computacional de 1.000 seqüências geradas de cada biblioteca, demonstraram que nas duas bibliotecas existiam genes que apareciam com alta, média e baixa frequência. Foram considerados como tendo alta frequência, genes formados a partir de 16 a 20 seqüências. Os genes, classificados como tendo frequência média, eram formados por cerca de três seqüências, enquanto, os genes, considerados como tendo baixa frequência de aparecimento eram formados por apenas uma seqüência (*singlets*). Para considerar um gene como sendo diferencialmente expresso, foi usado como parâmetro um aumento de no mínimo três vezes a frequência de aparecimento da sua seqüência (3:1), quando este gene era comparado nas duas bibliotecas, tratadas e não tratadas com IFN- γ . Com base neste parâmetro 24 seqüências foram selecionadas, e destas, 7 tiveram sua expressão diferencial confirmada por *northern blot*. Com o aumento da estringência para 4:1, o número de seqüências selecionadas diminuiu para 14, sendo que 5 tiveram a sua expressão confirmada por *northern blot*. Este fato demonstrou que o aumento da

estratégia leva a uma melhor proporção de genes diferencialmente expressos identificados corretamente.

Atualmente, existem diferentes ferramentas de subtração *in silico*. O UniGene é um sistema computacional *on line* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene>) que contém um conjunto não-redundante de genes divididos em vários grupos. Cada grupo contém seqüências de diversos organismos que representam um único gene, assim como informações a ele relacionadas, tais como tipos de tecidos, condições de expressão e localização física. A análise de expressão gênica diferencial em larga escala do UniGene é feita pelo método computacional DDD - *Digital Differential Display* - (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/info_ddd.html). O DDD compara o número de vezes que seqüências de bibliotecas diferentes são associadas a um certo grupo UniGene, reportando genes diferencialmente expressos. O DDD usa um método estatístico de comparação – o Teste Exato de Fisher – para identificar apenas aquelas diferenças que parecem ser significativamente relevantes. Um fator importante para determinar a relevância estatística é o número absoluto de ESTs, em cada biblioteca, que foram associadas com sucesso a um grupo UniGene.

Diversos trabalhos utilizam o UniGene DDD como ferramenta para inferir sobre expressão gênica (Dade *et al.* 2004; Li *et al.*, 2004; Paillison *et al.*, 2005; Butchko *et al.*, 2005). Particularmente Chen *et al.* (2006) analisaram informações de seqüências disponíveis nos bancos de dados públicos para identificar transcritos diferencialmente expressos em diversos tipos de câncer. A determinação de genes relacionados ao câncer que são comumente desorganizados em diferentes tipos de tumor pode facilitar a identificação de alvos para diagnósticos de câncer e tratamentos terapêuticos. Usando o UniGene DDD, estes autores compararam os níveis de expressão gênica de 10 tipos diferentes de tumor com células de tecidos normais. Foram identificados grupos que mostraram regulação transcricional em mais de 5 tipos de tumor e duas vezes mais expressos quando comparados com os tecidos normais. Foram identificados 127 novos genes super expressos e 92 novos genes reprimidos. Além disso, 19 genes envolvidos em câncer já conhecidos foram também identificados. Este trabalho revelou 219 candidatos a genes diferencialmente expressos em células cancerígenas, que podem contribuir para o entendimento do câncer.

Nesta tese, a subtração *in silico* foi usada para comparar a frequência relativa de ESTs presentes em uma das duas formas do *P. brasiliensis*. Não utilizamos o UniGene

DDD, uma vez que a comparação da expressão diferencial foi realizada utilizando ESTs de micélio e de levedura do próprio *P. brasiliensis*. Para esta análise, como será relatado posteriormente, o programa escolhido foi o IDEG6 (*Identification Differentially Expressed Genes*) (Romualdi *et al.*, 2003), uma ferramenta que permite a identificação de genes diferencialmente expressos por meio da análise estatística de matrizes de dados, em condições experimentais diferentes, e do cálculo do nível de significância desta diferença.

Arranjos de DNA

A tecnologia dos arranjos de DNA permite a obtenção de um *fingerprint* (impressão digital) molecular da expressão de vários genes simultaneamente (Jordan 1998; Grouse *et al.*, 2001). Assim, genes que são expressos de forma coordenada em um tipo celular particular (fase específica) ou genes expressos durante determinada condição biológica (de crescimento; diferentes temperaturas; genes envolvidos em diferentes processos patológicos; comparação da expressão gênica diferencial entre diferentes populações) podem ser eficientemente analisados por esta metodologia (Kudoh *et al.*, 2000; Grouse *et al.*, 2001).

Existem várias opções metodológicas de arranjos para avaliar o perfil de expressão gênica. A disponibilidade das bibliotecas de cDNA geradas em projetos de sequenciamento de transcriptomas, juntamente com a robótica de alta precisão e o depósito de pequenas amostras de DNA em superfície sólidas, tornou possível a preparação de arranjos constituídos por um grande número de genes.

Os arranjos de DNA são denominados macroarranjos ou microarranjos dependendo da forma como o DNA é depositado na superfície sólida (*nylon* ou vidro), bem como da distância (cm²) entre os *spots* (depósitos) de DNA (Passos *et al.*, 2000). No macroarranjo, o depósito do DNA é feito manualmente, com o auxílio de um replicador composto de 96 pinos. No microarranjo, o depósito é feito com o auxílio de um robô, o que possibilita uma maior densidade dos clones por cm² (aproximadamente 80 EST/cm²), enquanto nos macroarranjos o número de clones é de aproximadamente 8/cm², ou seja, dez vezes menor do que a densidade obtida nos microarranjos.

Nos microarranjos em *nylon*, o DNA é depositado em duplicata na mesma membrana, um ao lado do outro. As sondas são produzidas a partir do RNA das células em estudo por meio de uma reação empregando transcriptase reversa, na presença de nucleotídeos radioativos ($\alpha^{33}\text{P}$ -dCTP). As sondas são hibridadas contra os arranjos, e

quanto maior a expressão de um gene em determinada condição, maior será a intensidade do sinal obtido. Nos microarranjos em vidro, o processo é bastante similar ao de microarranjo em *nylon*, no entanto, as sondas, referentes a cada uma das condições em estudo, são sintetizadas em presença de fluorocromos diferentes (Cy3 ou Cy5), cuja emissão se dá em comprimento de onda diferente. Desta forma, as duas sondas são misturadas e em seguida hibridadas com o mesmo arranjo, o que é uma vantagem, pois pode-se utilizar a mesma lâmina para validar respectivamente diferentes situações experimentais.

A detecção da intensidade das duas sondas hibridadas no arranjo é realizada com o uso de um equipamento especial, o *Phosphor Imager*. Tanto nos experimentos utilizando macroarranjos como nos que utilizam microarranjos, após a reação de hibridação e lavagens, um *scanner* registra a intensidade dos pontos, gerando uma imagem. A partir desta imagem, gera-se uma tabela de valores numéricos, que são analisados por meio de métodos estatísticos para apontar genes diferencialmente expressos (Brown & Botstein 1999; Burgess, 2001).

A maior vantagem da tecnologia de microarranjos consiste na análise conjunta de um grande número de seqüências e na possibilidade de integração de grandes conjuntos de dados oriundos de diversos experimentos. Além disso, é um experimento relativamente rápido e eficiente. Apesar da sua grande utilidade e potencialidade, a tecnologia do microarranjo é limitada pelo alto custo dos equipamentos e disponibilidade de arranjos, uma vez que apenas a expressão dos genes seqüenciados de um organismo pode ser estudada. A sensibilidade restrita para transcritos pouco freqüentes é baixa, pois os mRNAs abundantes são bastante representados em bibliotecas de cDNA, enquanto que os transcritos raros são dificilmente clonados, apesar de muitas vezes serem genes regulatórios importantes.

Os microarranjos são bastante utilizados para o mapeamento e caracterização dos vários padrões de expressão gênica em humanos, associando-os a diferenças entre tipos de células e de tecidos, tanto nos processos fisiológicos normais quanto nas doenças. Experimentos *in vitro* têm mostrado aspectos da regulação fisiopatológica em estudos de expressão gênica em humanos, incluindo a identificação de genes periodicamente expressos durante o ciclo celular (Whitfield *et al.*, 2002), a resposta de células humanas a vários estímulos (Iyer *et al.*, 1999; Belcher *et al.*, 2000), e a definição de vias de sinalização celular (Fambrough *et al.*, 1999; Diehn *et al.*, 2002). Microarranjos permitem a análise da expressão gênica de certos tecidos ou células em

resposta a uma grande diversidade de estímulos, infecções ou processos patológicos tais como na presença de hormônios, drogas, citocinas (Der *et al.*, 1998; Iwata *et al.*, 2002), inflamação (Heller *et al.*, 1997; Kaminski *et al.*, 2000), viroses (Zhu *et al.*, 1998; Geiss *et al.*, 2000), ou em diferentes tipos de câncer (Alizadeh *et al.*, 2000; Amundson *et al.*, 1999; Golub *et al.*, 1999). Perfis de padrões de expressão gênica por meio de microarranjos estão ajudando a definir processos biológicos complexos associados tanto com a fisiologia normal quanto nas doenças (Whitney *et al.*, 2003).

Particularmente em fungos patogênicos a técnica de microarranjos tem sido utilizada. Para *C. neoformans*, genes termo-regulados a 37°C, temperatura essencial para o atributo da patogenicidade neste fungo, foram identificados por esta técnica. Estes Genes estão envolvidos em diversos processos celulares como: estresse oxidativo; genes que codificam para a biossíntese de ácidos graxos e pirimidinas, genes envolvidos na síntese de aminoácidos, e importantes fatores transcricionais. Por exemplo, o gene Mga2, importante para o crescimento e manutenção deste patógeno em altas temperaturas, é um importante alvo para drogas (Kraus *et al.*, 2004).

No fungo dimórfico *C. albicans* muitos trabalhos têm sido publicados mostrando a eficácia desta metodologia no estudo da expressão gênica deste fungo. Neste contexto, Nantel *et al.* (2002) utilizaram microarranjo para investigar o perfil transcricional de 6.333 ORFs, em resposta a mudanças na temperatura e modificações no meio de cultura. Genes relacionados a secreção e proteínas de superfície (Cu-Zn superóxido dismutase, proteínas ancoradoras a GPI); pequenas GTPases; moduladores do citoesqueleto e fatores de transcrição mostraram-se super expressos durante a transição de levedura para micélio, sendo esta diferenciação necessária para a infecção por este patógeno. Outros genes que codificam para proteínas de ligação ao DNA, metabolismo de lipídeos, proteínas de superfície (como por exemplo: FLO1-glicoproteína de parede celular, CSP37-fator de virulência) mostraram-se reprimidos. Microarranjos também têm sido usado em *C. albicans* para investigar a expressão diferencial de genes em presença e na ausência de diversos antifúngicos (Backer *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005, Enjalbert *et al.*, 2005), assim como para avaliar a expressão de genes associados à resistência a drogas de diferentes isolados (Barker *et al.*, 2004). Outros processos como acasalamento, formação de hifas (Zhao *et al.*, 2005), e reguladores transcricionais (Sohn *et al.*, 2003) também têm sido estudados utilizando microarranjo em *C. albicans*.

Em *H. capsulatum* 500 clones mostraram-se diferencialmente expressos e super regulados em uma das formas dimórfica deste patógeno. Destes genes destacam-se em

micélio: genes envolvidos na formação de conídios, polarização celular, fatores de virulência como genes envolvidos na produção de melanina. Em levedura foram encontrados genes envolvidos no metabolismo de enxofre, regulação do ciclo celular e envolvidos na transição dimórfica (Hwang *et al.*, 2003). Nittler *et al.* (2005), também utilizando microarranjos, identificaram 695 genes induzidos neste fungo em resposta a espécies reativas de oxigênio, relacionando a super expressão destes genes com a proteção e manutenção deste patógeno dentro do hospedeiro.

Embora as funções de muitas seqüências depositadas nos microarranjos não sejam conhecidas a priori, os níveis de expressão gênica determinados podem ser úteis na análise dos mesmos. A partir dos dados obtidos nestes experimentos, é possível interpretar as mudanças morfológicas e patológicas em nível do RNA em várias doenças, assim como definir alvos de drogas terapêuticas (Brown, 2000). Além disso, o padrão de expressão de genes em particular pode servir como um marcador molecular para o diagnóstico de estágios específicos de doenças (Fillmore *et al.*, 2002). Um exame detalhado dos dados gerados por microarranjos pode levar a uma visão dinâmica do modo de ação de uma determinada substância (Brown, 2000).

Como exemplo comercial desta estratégia de análise em larga escala, o arranjo de DNA da *Affymetrix* permite o depósito de oligonucleotídeos sintetizados *in situ*, representando um arranjo de até 60.000 clones em uma superfície de 1 cm² (Kurella *et al.*, 2001), permitindo a análise simultânea de um maior número de genes de um organismo em diferentes condições biológicas.

1.3.2.2 - Expressão gênica diferencial em *P. brasiliensis*

O nosso grupo tem trabalhado nos últimos 7 anos com o objetivo de identificar genes diferencialmente expressos em células de micélio e levedura de *P. brasiliensis* - Pb01 utilizando diversas técnicas, incluindo DDRT-PCR, análise de proteoma, *northern blot*, imunosscreening e microarranjo de cDNA.

Venâncio *et al.* (2002 e 2002 – anexo 9) relataram o isolamento e identificação de pelo menos 20 fragmentos de cDNAs diferencialmente expressos, isolados por meio da técnica DDRT-PCR, sendo que alguns desses fragmentos foram confirmados por *northern blot* e totalmente caracterizados. A análise de similaridade em bancos de dados indicou que dois desses genes eram membros da família das hidrofobinas, *Pbhyd1* e *Pbhyd2*, expressas diferencialmente na fase de micélio. As hidrofobinas são pequenas

proteínas hidrofóbicas, exclusivas de fungos, que revestem as hifas, favorecendo seu crescimento (Albuquerque *et al.*, 2004). Neste mesmo contexto, foram também caracterizados dois outros fragmentos, diferencialmente expressos na forma miceliana, denominados *PbM32* e *PbM51*, os quais não apresentam até o momento similaridade com nenhuma seqüência depositada em bancos de dados.

Proteínas totais das duas fases de *P. brasiliensis* foram analisadas através de gel de eletroforese bi-dimensional e/ou *western blot* utilizando soro de pacientes infectados com PCM (Cunha *et al.*, 1999; Fonseca *et al.*, 2001). Dentre estas proteínas, Cunha *et al.* (1999) identificaram uma proteína, específica da fase de levedura, com aproximadamente 20 kDa. Inicialmente, apenas 34 resíduos de aminoácidos da porção N-terminal dessa proteína foram seqüenciados. Análises em bancos de dados mostraram que estes aminoácidos apresentaram uma similaridade de 90% com alérgenos específicos de *Alternaria alternata* e *Cladosporium herbarium*. Daher *et al.* (2005) demonstraram que este gene codifica uma proteína pertencente a família WrbA (flavodoxina), as quais podem estar envolvidas na proteção contra choque térmico ou estresse oxidativo em sistemas biológicos. Sugerindo um importante papel deste gene na transição e/ou manutenção da forma de levedura deste patógeno.

O gene *hsp70* de *P. brasiliensis*, isolado e seqüenciado por Silva *et al.*, (1994), codifica uma proteína de 649 resíduos de aminoácidos, e é induzido diferencialmente em células de leveduras durante o choque térmico (42°C) e durante o processo de transição celular de micélio pra levedura. Desse modo, Silva *et al.* (1999) sugerem que a HSP70 provavelmente desempenhe um papel importante no processo de diferenciação do *P. brasiliensis*, aumentando a resistência do organismo ao estresse sofrido durante o processo de invasão ao hospedeiro.

Um outro gene que codifica a proteína de choque térmico *hsp60* de *P. brasiliensis* foi clonado e caracterizado (Salem-Izacc *et al.*, 2000). A expressão da proteína HSP 60 é regulada durante a transição em *P. brasiliensis*, uma vez que diferentes níveis do transcrito foram detectados por *northern blot*. A maior expressão de HSP60 em células de levedura do que em micélio sugere que esta proteína possa ser necessária para a sobrevivência deste fungo no hospedeiro, tendo também papel importante em sua morfogênese diferencial. Neste mesmo trabalho foi demonstrado que a proteína recombinante reagiu com anticorpo monoclonal anti-*hsp60* e tanto a proteína HSP60 nativa como a recombinante foram reconhecidas por soro de pacientes com PCM. Esses resultados corroboram a possibilidade da HSP60 contribuir para o

desenvolvimento da imunidade protetora em pacientes com PCM, como descrito em outros fungos.

CLpB é uma proteína de choque térmico, preferencialmente induzida na forma de levedura de *P. brasiliensis*. Representante da família ClpATPase funcionam como chaperonas moleculares, prevenindo a desnaturação e agregação de proteínas em altas temperaturas, promovendo o re-enovelamento de polipeptídeos agregados (Jesuino *et al.*, 2002).

Pereira *et al.* (2000) clonaram e identificaram o gene *PbFKS1*. Esse gene possui uma região promotora de 1.235 pb, dois *introns* e uma fase aberta de leitura de 5.781 nucleotídeos. A partir dessa seqüência de nucleotídeo, foi deduzida uma proteína de 212 kDa, denominada β -1,3-glucana sintase, responsável pela síntese de β -1,3-glucana da parede celular de *P. brasiliensis*. Foi observado que β -glucana sintase está presente em maior quantidade na forma miceliana, enquanto que α -glucanas prevalecem na parede celular da levedura (Kanetsuna *et al.*, 1969), sugerindo uma possível participação destas enzimas na transição dimórfica do *P. brasiliensis*. Os autores discutem também neste trabalho, que drogas, como as da família equinocandina, descritas como inibidores potentes de β -1,3-glucana sintase em vários fungos, poderiam ser utilizadas no controle da PCM bloqueando a biossíntese da parede celular em *P. brasiliensis*.

Também foi caracterizado um gene que codifica para a proteína calmodulina e mostrado que a via de transdução de sinal Ca^{+2} /Calmodulina é importante para a transição dimórfica do *P. brasiliensis* (Carvalho *et al.*, 2003). Neste trabalho, experimentos utilizando diferentes drogas inibidoras da ação da Calmodulina foram testadas, e observou-se que estas drogas inibiram a diferenciação celular de micélio para levedura. Esses resultados evidenciaram fortemente a importância desta via na transição de micélio para levedura, caminho natural e essencial para o estabelecimento da infecção.

Moreira *et al.* (2004) identificaram uma catalase em *P. brasiliensis*, mostrando que os níveis de expressão deste gene são menores em micélio do que em levedura e tendem a aumentar durante a transição dimórfica e quando o fungo é exposto a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estes dados sugerem a participação da catalase no mecanismo de defesa deste patógeno e o seu importante papel em mecanismos de virulência. Neste contexto, Barbosa *et al.* (2004) isolaram um gene para a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) diferencialmente expresso na forma de levedura. Por meio de imunoeleto-microscopia e análise por *western blot* demonstraram o papel desta

proteína como uma adesina, envolvida na ligação destas células a fibronectina, colágeno tipo I e laminina, contribuindo provavelmente para a adesão deste patógeno ao tecido do hospedeiro e sua disseminação no processo infectivo (Barbosa *et al.*, 2006). Outros genes diferencialmente expressos em levedura também foram descritos: manosiltransferase, malato desidrogenase, fructose bifostato aldolase e triose fosfato isomerase (Pereira *et al.*, 2004).

Em paralelo a este trabalho de tese, estudos com o isolado *P. brasiliensis* – *Pb18*, usando SSH e macroarranjo de cDNA, foram relatados (Marques *et al.*, 2004). Neste trabalho por meio da técnica de SSH foram subtraídos os cDNAs igualmente expressos em ambas as fases, restando somente os cDNAs expressos exclusivamente na fase de levedura, os quais foram analisados. De 1.397 genes analisados, foram descritos 52 genes diferencialmente expressos em levedura. Porém, para uma análise mais detalhada das funções destes genes, são necessários experimentos que confirmem o papel destes genes na transição dimórfica e, conseqüentemente, no estabelecimento da PCM.

Embora diversos aspectos da biologia molecular do *P. brasiliensis* tenham sido estudados, um melhor entendimento da função gênica no processo biológico ainda é necessária. Este aspecto só poderá ser bem entendido quando as ferramentas genéticas se tornarem disponíveis para este organismo. Considerando as dificuldades inerentes das características deste patógeno, em especial o número variável de cromossomos entre diferentes isolados (Feitosa *et al.*, 2003) e a presença de células multinucleadas que dificultam a utilização de metodologia de ruptura gênica, outras abordagens genéticas podem ser utilizadas para o estudo da função gênica, tal como RNA interferência (RNAi). Entretanto, apenas recentemente foram relatados protocolos de transformação genética para *P. brasiliensis*. Neste contexto, Leal *et al.* (2004) relataram a obtenção de transformantes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* e Soares *et al.* (2005) demonstraram a obtenção de transformantes com resistência adquirida a higromicina-B. Entretanto, a eficiência de transformação ainda é baixa, sendo necessário a otimização destes protocolos bem como o desenvolvimento de técnicas, tais como RNA interferência visando o estudo da função gênica. RNAi tem sido usado com sucesso em outros fungos como *C. albicans*, *C. neoformans*, *H. capsulatum* e *N. crassa*, constituindo uma perspectiva promissora para o estudo da função gênica em *P. brasiliensis*.

2 - JUSTIFICATIVA

A capacidade de um parasita colonizar um hospedeiro está relacionada à mudança no seu perfil de expressão gênica, para que esse parasita possa se adaptar a este novo ambiente, o hospedeiro. Conforme observado em outros fungos patogênicos, como *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *C. immitis* e *C. albicans*, também para o fungo *P. brasiliensis* o processo dimórfico é um importante evento no estabelecimento da infecção. Na PCM, a transição de micélio para levedura é uma condição necessária para o estabelecimento da infecção do *P. brasiliensis* no hospedeiro humano. Para que os mecanismos básicos de patogenicidade/virulência de *P. brasiliensis* sejam identificados, e conseqüentemente o desenvolvimento de estratégias para o controle da infecção, é fundamental identificar genes diferencialmente expressos durante o processo de adaptação e manutenção deste patógeno, bem como na resposta do hospedeiro. A identificação e caracterização do maior número possível destes genes permitirão investigar mecanismos que ajudarão a compreender o processo molecular do dimorfismo em *P. brasiliensis*, o que contribuirá para o desenvolvimento de mecanismos que bloqueiem a transição de micélio para levedura, impedindo assim o estabelecimento da infecção.

Neste contexto, no final de 2001, foi aprovado o projeto “Genoma Funcional e Diferencial do *P. brasiliensis*” (<http://www.biomol.unb.br/Pb>), que fez parte das redes Genoma Regionais apoiado pelo MCT/CNPq. Este projeto teve como principal objetivo a identificação de genes: (i) diferencialmente expressos em células de micélio e levedura; (ii) relacionados ao metabolismo geral e diferencial deste patógeno; (iii) relacionados a vias de transdução sinal e envolvidos na transição dimórfica, proliferação, construção da parede de celular, osmorregulação e crescimento em alta temperatura; (iv) relacionados a interação patógeno-hospedeiro e (v) relacionados a potenciais alvos para drogas. A análise funcional destes genes deverá conduzir à comprovação de alvos para drogas que poderiam ser utilizadas no tratamento da doença, ou ainda poderão fornecer informações sobre genes que codificam proteínas de relevância durante a infecção.

O presente trabalho tem como propósito a análise da expressão diferencial de genes em micélio e levedura envolvidos no metabolismo geral, em especial o de carboidratos, metabolismo de enxofre, transporte de íons e organização celular (parede celular, membrana citoplasmática e citoesqueleto). Para tanto, os métodos de subtração *in silico* e de microarranjos de cDNA foram utilizados para análise em larga escala de

genes diferencialmente expressos, gerando informações relevantes sobre o conteúdo gênico informacional do *P. brasiliensis*. Este trabalho permitirá uma maior compreensão da biologia deste patógeno bem como a identificação de genes candidatos a novos alvos para drogas.

3 - OBJETIVOS

3.1 - OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho é o de realizar uma análise global dos genes identificados no transcriptoma deste patógeno, bem como identificar os genes de expressão diferencial nas formas de micélio e levedura de *P. brasiliensis*, utilizando subtração *in silico* e microarranjos de cDNA.

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

As ESTs utilizadas neste trabalho foram geradas a partir dos bancos de cDNA de micélio e levedura de *P. brasiliensis*. Estas seqüências foram montadas (CAP3), analisadas e categorizadas funcionalmente através do uso de programas BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), e dos bancos de dados GenBank *nr*, GO (*Gene Ontology*), COG (*Cluster of Orthologous Groups – Functional annotation*) e MIPS (*Munich Information Center for Proteins Sequences*). Após esses procedimentos, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

3.2.1 - Realizar a análise global dos genes do transcriptoma do *P. brasiliensis* tais como: 1) genes super expressos, 2) potencialmente relacionados a virulência/alvos para drogas, 3) interação patógeno-hospedeiro, 4) vias de transdução sinal, 5) transportadores tipo MDR (*multidrug resistance*), 6) genes de choque térmico e 7) estresse oxidativo.

3.2.2 - Identificar genes diferencialmente expressos nas formas de micélio e levedura deste patógeno, por meio de análises de subtração *in silico* de ESTs e de microarranjos de cDNA, bem como validar a expressão diferencial dos genes identificados por *northern blot*. Estas análises permitiram a identificação de um padrão diferencial de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos, no metabolismo de enxofre, no transporte de íons e na organização celular de micélio e levedura.

4- METODOLOGIA

4.1 - Microrganismos utilizados neste trabalho

P. brasiliensis - Isolado Pb01 (ATCC-MYA-826) obtido de um paciente com PCM. Células micelianas e leveduriformes foram crescidas em meio semi-sólido Fava Neto (Fava Neto, 1965), durante 14 dias por incubação à temperatura de 22°C (fase miceliana) e durante 7 dias a 36°C (fase leveduriforme).

Escherichia coli - linhagem XL1-blue MRF' (Stratagene) {(*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *supE44*, *relA1*, *lac* [F' *proAB laqI_q* Δ M15, Tn 10 (*Tet^r*)]}

Escherichia coli - linhagem SOLR { $e14^-$ (*McrA*⁻) Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171 *sbcC recB recJ uvrC umuC::Tn5* (Kan^r) *lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1* λ^R [F' *proAB lacIqZ.M15*] *Su*⁻ (não supressora)}.

4.2 - Construção dos bancos de cDNA de micélio e levedura

Os bancos de cDNA de micélio e levedura foram construídos no vetor unidirecional e de expressão λ ZAP (Stratagene). O RNA total das células na forma miceliana e leveduriforme foi extraído separadamente usando o reagente TRIZOL (Gibco/BRL) e a fração poli (A⁺) isolada a partir de uma coluna de oligo (dT)-celulose. Essas moléculas de RNAs mensageiros foram utilizadas para a síntese dos respectivos cDNAs.

A primeira fita foi sintetizada utilizando-se a enzima MMLV-RT e um oligonucleotídeo (dT) contendo um sítio para a enzima de restrição *XhoI*, que se liga a porção 3' poli (A⁺) do RNA molde. Essa reação foi suplementada com 5-metil dCTP, o qual protege o cDNA de uma possível clivagem quando submetido à reação com a enzima de restrição. Para a síntese da segunda fita, a RNase H foi utilizada para digerir a fita de RNA, produzindo múltiplos fragmentos que servem como iniciadores para a DNA polimerase I.

Após a síntese completa do cDNA, pequenas seqüências compostas de 10 a 14 nucleotídeos (adaptadores) foram acopladas às extremidades do cDNA-dupla fita. Estes

adaptadores possuem extremidades coesivas correspondentes ao sítio de restrição para enzima *EcoRI*. Estas extremidades são defosforiladas, evitando assim a ligação de uma extremidade à outra. A digestão com a enzima *XhoI* libera o adaptador da extremidade 3' do cDNA, tornando sua ligação direcionada *EcoRI-XhoI* nos braços do vetor UNI-ZAP XR vector (*Stratagene*). Esse vetor possui na sua constituição a seqüência correspondente ao fagomídeo pBluescript, sendo a clonagem de cDNA feita em seus múltiplos sítios únicos de clonagem (*polylinker*), o qual possui 21 sítios únicos de clonagem flanqueados pelos promotores T3 e T7.

Posteriormente a construção dos bancos, os fagos recombinantes foram empacotados segundo as instruções do fabricante, e tiveram o seu título determinado para os respectivos bancos, micélio e levedura, em torno de 10^9 pfu/ml (*plaque forming unit*).

4.3 - Obtenção de ESTs de micélio e levedura

Para o plaqueamento dos bancos de cDNA, foram utilizadas células de *E. coli* da linhagem XL1-blue MRF' (*Stratagene*) cultivadas em meio LB-ágar contendo tetraciclina (12,5 µg/ml), crescidas durante a noite a 37°C. A partir desta cultura, uma colônia isolada foi transferida para 5 ml de meio NZY (caseína hidrolizada 10g, extrato de levedura 5g, NaCl 5g, MgSO₄.7H₂O, pH 7,5) suplementado com 0,2% de maltose e de 10mM de MgSO₄ e a cultura foi incubada sob agitação a 37°C durante a noite. As células foram centrifugadas a 600g durante 10 minutos e o sobrenadante descartado, sendo adicionado a seguir igual volume de MgSO₄ 10mM, à 4°C. Antes do uso, as células foram diluídas para uma concentração de 600nm, OD600 = 0,5 em MgSO₄ 10mM, determinada por uma leitura espectrofotométrica.

4.4 - Plaqueamento dos bancos de cDNA de micélio e levedura

O meio NZY Agar (Botton-agar) foi transferido para placas de Petri (150mm), as quais foram mantidas por até 12 horas à temperatura ambiente e, pouco antes do plaqueamento, foram transferidas para 37°C durante 1-2 horas. O meio top-ágar foi fundido, distribuído em alíquotas de 8-10 ml e mantido em banho-maria à temperatura de 58 °C. Em um tubo de microcentrifuga estéril, foi adicionado o volume correspondente a 500 pfu do respectivo banco de cDNA, micélio ou levedura, (5 µl de

uma diluição de 10^5 pfu/ml) e 200 μ l de células a uma OD_{600nm} = 0,5, anteriormente preparadas. Em seguida foram incubados a 37°C durante 15 minutos. A mistura de cada tubo foi adicionada aos 8-10 ml do meio Top-agar, homogeneizada e imediatamente vertida sobre as placas contendo o meio NZY-Botton-agar. O material foi incubado por no mínimo 12 horas a 37°C, para visualização das placas de lise isoladas.

4.5 - Eluição dos fagos

As placas de lise individualizadas foram coletadas aleatoriamente utilizando-se ponteiros de maior diâmetro (1,52 milímetros - *Axygen*). Cada placa de lise foi transferida para cada poço da microplaca de policarbonato de 96 poços, contendo 100 μ L de tampão SM acrescidos de 5 μ l de clorofórmio. Os fagos foram eluídos por um período de 4 horas à temperatura ambiente ou a 4°C durante a noite.

4.6 - Amplificação das ESTs

As ESTs para o seqüenciamento foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) dos fagos eluídos. Para tanto, foram utilizadas na reação: 5 μ l da suspensão de fagos eluídos a partir de apenas uma placa de lise, o que contém aproximadamente 10^8 fagos/100 μ l (5×10^6 fagos/5 μ l); 0,04 μ M de oligonucleotídeos T3 e T7 (solução estoque 2 μ M de cada um); 0,2 mM de dNTPs (solução estoque 25 mM de cada um); 2,5U de Taq DNA polimerase (CENBIOT) (solução estoque 5U/ μ l) e, 5 μ l do tampão (10X) da Taq Polimerase contendo: 1,5 mM de MgCl₂ (solução estoque 50mM) e 0,5 μ l de BSA 0,1 mg/ml na concentração estoque de 10 mg/ml. O volume final da reação foi de 50 μ l. O programa utilizado para a amplificação dos fragmentos foi: 93°C/ 2 min; seguido de 35 ciclos de 93°C/ 1 min; 50°C/ 1 min; 72°C/ 1,5 min; finalizado em 72°C/ 5 min e 4°C por tempo indeterminado. Após a amplificação, aproximadamente 1/10 do volume do sistema de reação foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo (0,5 μ g/ml), em tampão TBE 1X (Sambrook & Russel, 2001).

4.7 - Excisão dos fagos

O procedimento de excisão *in vivo* em massa do banco de cDNA de *P. brasiliensis*, tanto da forma de micélio quanto a de levedura, foi feito de acordo com o protocolo sugerido pelo próprio fabricante do kit de construção de banco (λ Zap II - Stratagene®).

O processo é definido pelo reconhecimento da origem de replicação do bacteriófago f1 (denominado de “fago *helper*”), flanqueando o vetor pBluescript SK⁻ (que se encontra inserido no DNA do bacteriófago lambda, fornecido pelo fabricante), por proteínas do mesmo. Dentro da bactéria *E. coli*, uma destas proteínas do bacteriófago f1 clivara uma das fitas do DNA do bacteriófago lambda. A partir deste ponto de clivagem uma nova síntese de DNA simples fita é iniciada e duplica todo DNA que se encontrava clonado a 3' deste sítio no bacteriófago lambda, até a chegada no sítio de terminação da replicação do bacteriófago f1. Em seguida, a molécula de DNA fita simples é circularizada por proteínas do bacteriófago f1, formando uma molécula de DNA circular contendo toda a seqüência que se encontrava entre os sítios de iniciação e terminação, o que inclui as seqüências do vetor pBluescript SK⁻ e o inserto clonado inicialmente no bacteriófago lambda. Por fim, este DNA é empacotado pela maquinaria protéica do bacteriófago f1, gerando partículas virais denominadas fagomídeos, que serão utilizados para transformar uma linhagem de *E. coli*.

A biblioteca primária foi feita inicialmente com 10^8 células de *E. coli* da linhagem XL1-Blue MRF['], preparadas conforme descrito anteriormente. Esta bactéria é considerada ótima hospedeira principalmente por possuir genes para a expressão do pili bacteriano F['], importantes para uma melhor infecção dos bacteriófagos. Também foram adicionados neste momento 10^8 pfus do bacteriófago f1. Esta infecção foi incubada a 37°C, por 2 horas e 30 minutos em 20ml de meio LB, sob agitação para que acontecesse a excisão completa e conseguinte amplificação exponencial dos clones. Em seguida, a suspensão foi incubada a 70°C por 20 minutos com a finalidade de promover a lise bacteriana total, liberando o produto excisado para o meio, seguida de uma centrifugação a 1.000xg por 10 minutos, para precipitação dos resíduos celulares, uma vez que as partículas virais ficaram em suspensão. Para evitar problemas com co-infecção com o bacteriófago f1, a linhagem de *E. coli* utilizada para a infecção com os fagomídeos excisados foi a SOLR.

As células SOLR foram centrifugadas a 600xg durante 10 minutos e o sobrenadante descartado, sendo adicionado a seguir igual volume de MgSO₄ 10mM, à 4°C. Antes do uso, as células foram diluídas para uma concentração de OD₆₀₀ = 0,5 em MgSO₄ 10mM, determinada por leitura espectrofotométrica. Assim, 10⁸ células de *E. coli* foram infectadas com a diluição de 1:1000 dos fagomídeos excisados, e em seguida plaqueadas em meio LB suplementado com 1,5% (p/v) de ágar e 100 µg/ml de ampicilina, permanecendo em estufa a 37°C por 16 horas.

4.8 – Mini preparação de plasmídios

Os clones de cDNA, contendo o plasmídio pBluescript SK⁻ e o respectivo inserto, foram isolados e crescidos em placas *Deep Well* de fundo em “U” contendo 1ml de meio 2XYT líquido suplementado com 0,5% (p/v) de glicose e 100µg/ml de ampicilina a 37°C, sob agitação durante 22 horas. Um volume de 100µl de cada inóculo foi transferido para as mesmas posições em outra placa e estocado em glicerol 35% (v/v) a -80°C. Os 900µl restantes de cada cultura foram centrifugados a 4.000xg durante 6 minutos a temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante o precipitado celular foi ressuspensão em 30µl de uma solução tamponante GET (glicose 1% (p/v); 100 mM EDTA pH 8,0; 25 mM Tris-HCl pH 7,4), contendo RNase A para uma concentração final de 400µg/ml. Em seguida, a placa foi novamente centrifugada a 4.000xg durante 6 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 60µl de solução de lise celular (NaOH 0,2 M e SDS 1%). A placa foi selada e invertida cerca de 30 vezes, seguida de incubação a temperatura ambiente por 10 minutos, sendo adicionados 60µl de acetato de potássio 3M pH 5,5. A seguir, a placa foi centrifugada a 10.000xg durante 15 minutos a temperatura ambiente. O lisado celular foi transferido respectivamente para uma nova placa acoplada a um filtro Millipore de 0,22 µm. O sobrenadante foi filtrado, precipitado com 100µl de isopropanol e em seguida centrifugado a 4.000xg durante 45 minutos a 20°C. O DNA plasmidial foi lavado com 200µl de etanol 70% gelado, novamente centrifugado a 4.000xg por 15 minutos a 4°C e ressuspensão em 20µl de água destilada.

4.9 – Seqüenciamento

Os fragmentos amplificados através da PCR bem como o DNA plasmidial foram analisados e quantificados em gel de agarose 0,8% e cerca de aproximadamente 60-100ng do DNA foram utilizados diretamente na reação de seqüenciamento. Esta reação foi composta de: 1µl da reação de PCR dos fagos eluídos (60-100ng), 4 µl do pré-mix do kit “*DYEnamicTMET - Dye terminator kit*” para MegaBACE - *GE Healthcare*, 5 pmoles do respectivo oligonucleotídeo T3 (seqüenciamento da região 5’ do cDNA) em um volume final de 10µL. Esse sistema de reação foi submetido a amplificação por PCR constituída de 30 ciclos de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C, 1 minuto a 60°C e finalizado a 4°C. As amostras foram preparadas em água MiliQ e foram submetidas diretamente ao seqüenciador automático (MegaBace 1000 sequencer – *GE Healthcare*) nas seguintes condições: pré-corrída da matriz do seqüenciador de 9KV por 1 minuto, injeção das amostras de 3KV por 60 segundos e o seqüenciamento a 6KV por 20 minutos a uma temperatura de 44°C.

4.10 - Análise computacional

Os eletroferogramas resultantes do seqüenciamento foram analisados pelo programa PHRED (Ewing & Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998), e as seqüências correspondentes aos vetores foram eliminadas através do programa CrossMatch (Green, 1996). Somente as seqüências que apresentaram um índice PHRED maior ou igual a 20, foram selecionadas. As ESTs foram agrupadas utilizando o programa CAP3 (Huan & Madan, 1999). Seqüências similares formaram um *contig*, que era representado por uma única seqüência consenso de várias ESTs agrupadas, e os *singlets*, seqüências únicas que não apresentaram similaridade com nenhuma outra seqüência.

4.11 - Anotação das ESTs

As seqüências consenso dos *contigs* e os *singlets*, denominados grupos, PbAESTs foram anotados através da comparação das seqüências geradas com a de outros organismos, utilizando o programa BLASTx (Altschul *et al.*, 1997) e os bancos de dados GenBank *nr* (não-redundante, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), COG-*Cluster of Orthologous Groups* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>) e GO-*Gene Ontology*

(<http://www.geneontology.org/>). Os grupos foram divididos em 15 categorias funcionais de acordo com o MIPS - *Munich Information Center for Proteins Sequences* (<http://mips.gsf.de>) e diversas vias metabólicas foram identificadas utilizando o banco de dados KEGG (<http://www.genome.ad.jp/kegg/>).

4.12 - Subtração *in silico* de ESTs

A subtração *in silico* de ESTs foi feita utilizando as seqüências de micélio e levedura geradas durante o projeto. Para cada *contig* foi computado o número de ESTs de micélio (M) ou levedura (L) que o formava, gerando uma razão M:L ou seja, foi realizada uma comparação quantitativa entre o número relativo de ESTs presentes nos bancos de cDNA de micélio ou no banco de levedura. Os *contigs*, formados por no mínimo 4 ESTs de diferença entre micélio e levedura em um único grupo, foram considerados como genes diferencialmente expressos. Os *singlets* por serem constituídos por seqüências únicas em uma das formas foram todos considerados diferencialmente expressos. Foi utilizado ainda o programa IDEG6 (*Identification Differentially Expressed Genes*) para confirmar os genes diferencialmente expressos indicados pela subtração *in silico*. Entre os métodos de análise disponíveis neste programa, o método estatístico escolhido foi o proposto por Audic & Claverie (1997). Este programa foi empregado por sua eficiência, sendo de 5%, o limiar aplicado o que indica 95% de confiabilidade nos resultados.

4.13 - Microarranjos de cDNA

4.13.1 - Amplificação e purificação das ESTs

Os 1.152 insertos de cDNAs selecionados foram obtidos por PCR dos fagos ou PCR dos plasmídeos excisados. Após a seleção, estes insertos foram re-amplificados novamente (cinco a seis vezes) por PCR para assegurar a concentração de DNA adequada para a preparação dos microarranjos (0.5-1µg/µl). Para estas re-amplificações foram utilizados as mesmas condições e o mesmo programa da PCR descrito anteriormente no item 4.6. Para a purificação, o produto equivalente a 6 amplificações foi transferido para placas *multiwell* com fundo em “U” e foram adicionados a cada poço 5µl de acetato de sódio 3M pH 4,8 e 125µl de etanol absoluto. As placas foram

incubadas por 16 horas a -20 °C e centrifugadas (4.000xg, 4°C) durante 60 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi lavado com 175µl de etanol 70% e centrifugado durante 30 minutos (4.000 g, 4°C). Novamente o sobrenadante foi retirado, os precipitados foram secos a temperatura ambiente por 20 minutos e ressuspenso em 20µl de uma solução de água: DMSO 1:1. Deste material, 2 µl foram submetidos a eletroforese em gel de agarose para análise e estimativa da quantidade de cada um.

4.13.2 - Preparação das membranas de nylon para os microarranjos de cDNA

As membranas de *nylon Hybond N⁺* (GE Healthcare) foram recortadas (2,5 x 7,5cm) e coladas sobre lâminas de vidro como suporte. Os produtos de PCR purificados foram transferidos para microplacas de 384 poços (RPK 0195 GE Healthcare) e depositados sobre as membranas com o auxílio do aparelho *Array Spotter Generation III* (GE Healthcare – Molecular Dynamics, USA). Um volume de 0,9nl de cada amostra de cDNA foi depositado na superfície da membrana. Foram aplicados os cDNAs dos 1.152 clones, os quais foram divididos em 2 membranas, cada uma contendo 576 seqüências em duplicata. Devido a diferença existente na concentração dos produtos da PCR (fortes e fracos), e na tentativa de minimizar os erros durante a análise dos dados, os fragmentos de PCR foram depositados em uma mesma membrana 3 vezes pela agulha do robô (fortes), enquanto que na outra membrana os produtos de PCR foram depositados 9 vezes (fracos). As membranas foram retiradas do suporte de vidro e transferidas para folhas de papel de filtro embebidas em solução desnaturante (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) tendo sido mantidas nesta solução durante 20 minutos. A seguir, as membranas foram incubadas em solução neutralizante (Tris HCl pH 7,4 1M; NaCl 1,5 M) durante 20 minutos e lavadas rapidamente em solução 2x SSC com o lado contendo os clones voltados para cima. O DNA das membranas foi fixado durante 2 horas a 80°C e a seguir na luz UV (*cross-link*) por 2 minutos. O DNA genômico de *P. brasiliensis* foi usado como controle positivo (15 - 50ng) e água e Poli A como controles negativos.

4.13.3 - Hibridação do oligo-vetor

A hibridação com oligo-vetor tem por finalidade avaliar a qualidade das membranas geradas, determinando a quantidade de DNA depositada em cada ponto do microarranjo, além de apontar os pontos (*spots*) defeituosos após a marcação. Os

resultados desta hibridação são utilizados posteriormente na normalização e análise dos dados obtidos após a hibridação com o RNA total de interesse marcado.

Para a detecção do padrão de pontos por hibridação com oligo-vetor, as membranas foram submetidas à pré-hibridação a 42°C, durante a noite, em 12ml de solução de pré-hibridação: 5X SSC, 5X solução Denhardt's, 0,5% SDS, acrescida de 100 µg/ml de DNA esperma de salmão desnaturado. Para a marcação do oligo-vetor, 1µl do oligonucleotídeo T3 foi marcado com fósforo radioativo segundo o seguinte protocolo: 3µl [γ -³³P] ATP 5000Ci/mM (*GE Healthcare*); 5µl de tampão 10x T4 polinucleotídeo quinase, (*Biolabs*); 1µl de T4 polinucleotídeo quinase (100U/µl, *Biolabs*) para um volume final de 25µl. A reação foi incubada durante 10 minutos a 37°C, seguido de uma nova incubação a 65°C durante 10 minutos. Para eliminar o ³³P não incorporado, o produto da reação foi filtrado em coluna de *Sephadex G50*. A sonda foi adicionada à solução de hibridação e as membranas foram hibridadas durante a noite a 42°C, lavadas com 1 litro de solução 2X SSC e 0,1% SDS por 10 minutos a temperatura ambiente e 5 minutos, com a mesma solução, a 42°C e expostas à placa de sensibilidade por 24 horas. A leitura dos sinais de hibridação foi feita utilizando o aparelho leitor de fósforo radioativo *Phosphor Imager Cyclone (Packard Inst. EUA)*.

4.13.4 – Preparo e hibridação das sondas complexas

As sondas de cDNA, denominadas sondas complexas pois contêm potencialmente todos os cDNAs retrotranscritos do RNA total do fungo, foram preparadas pela transcrição reversa a partir de RNA total extraído de micélio e levedura independentemente.

Foram realizadas marcações de amostras de RNA extraídas de três culturas de micélio e levedura independentes. Para proceder-se a transcrição reversa, 10µg de RNA total de cada amostra, foram aquecidos a 70°C juntamente com 5µg de oligo (dT25), promovendo desta forma o anelamento do oligo dT com as caudas poli-A dos RNAs mensageiros. Foram adicionados a seguir: 1µl de RNAsin (Promega, 40U/µl); 6µl de tampão 5x; 2µl de DTT 0,1M; 0,6µl de dATG 20mM; 0,6µl de dCTP 120µM; 3µl de α ³³P dCTP 10µ Ci/µl (≥ 3000 Ci/mM); 1 µl de transcriptase reverse (SUPERScript RNase H free RT, BRL, 200U/µl); 2,8 µl de água (q.s.p. 30 µl). A reação foi incubada a 42°C durante 1 hora, após este período foi adicionado mais 1 µl de transcriptase reversa e a reação foi novamente incubada por 1 hora a 42°C. Em seguida foram adicionados:

1µl de SDS 10%; 1µl de EDTA 0,5M; 3µl de NaOH 3M para a completa degradação dos mRNA moldes e dos rRNA. A reação foi incubada a 68°C durante 30 minutos, seguido de 15 minutos a temperatura ambiente.

Para neutralização foram adicionados 10µl de Tris 1M e 3µl de HCl 2N. O volume foi ajustado para 100µl e a sonda foi purificada em coluna *Sephadex G50*, quantificada no cintilador (cerca de 400.000 cpm). Neste momento foram adicionados 2µg de A80 e a mesma foi desnaturada durante 5 minutos a 100 °C. Após esta etapa, para o processo de hibridação, as membranas foram incubadas com as respectivas sondas acrescidas de solução de hibridação (5X SSC, 5X solução Denhardt's, 0,5% SDS) durante 48 horas a 65°C. As membranas foram lavadas da seguinte forma: SSC 0,1X, SDS 0,1% a 68°C, durante 3 horas, e em seguida expostas as placas sensíveis à radioatividade do sistema *Phosphor Imager Cyclone*, durante 48 horas, para captação dos sinais de hibridação. A digitalização dos sinais em imagens foi feita pelo programa *OptiQuant* (Packard Instruments, USA).

4.13.5 - Quantificação dos sinais de hibridação

Os pontos de hibridação foram identificados e os sinais foram quantificados através do programa BZScan (desenvolvido no TAGC-Inserm, Marseille, FR) (Rougemont *et al.*, 2003), disponível no site <http://tagc.univ-nrs.fr>. Este programa realiza o cálculo da intensidade dos pontos de deposição com o reconhecimento da área limite do ponto (borda do ponto), através da criação de grades, transformando a somatória dos sinais (*pixels*) em valores numéricos brutos. Desta forma, o BZScan é capaz de moldar a grade de quantificação dos pontos e quantificar os valores de intensidade apenas nesta área, minimizando assim o efeito de interferências (*background*). Este programa utiliza também o modo de visualização tridimensional dos pontos para avaliação do alinhamento das grades de quantificação e dos cálculos realizados para o controle de interferência e saturação do sinal.

4.13.6 - Análises dos dados

Mesmo usando o programa BZCan, o que corrige e minimiza a intensidade do *background*, é preciso que este seja subtraído e que os dados sejam normalizados (Quackenbush, 2002). Para proceder à subtração do *background* e a normalização dos

valores obtidos, foi feita inicialmente a verificação da correlação entre os valores obtidos após quantificação do vetor e da sonda complexa. As membranas que apresentaram uma correlação, razão sinal vetor/sinal da sonda complexa, acima de 0,95 foram consideradas para as análises subseqüentes, enquanto que as membranas que apresentaram baixa correlação foram retiradas da análise. Em seguida, para a normalização, os valores numéricos obtidos após a quantificação da sonda complexa foram subtraídos da mediana do controle negativo (água) somado com o desvio padrão do mesmo controle. Os valores resultantes após este procedimento foram divididos pela mediana calculada para todos os valores positivos. Os valores negativos quando presente em duas ou mais membranas foram filtrados, não sendo considerados para análise.

4.13.7- SAM – Análise dos microarranjos de cDNA para identificação dos genes de expressão diferencial

Para a identificação de genes diferencialmente expressos foi utilizado o programa SAM-*Significant Analysis of Microarrays* (<http://wwwstart.stanford.edu/~tibs/SAM/index.html>) (Tusher *et al.*, 2001). Este programa utiliza um método de análise baseado em uma série de testes-t específicos para cada par de genes, adaptados para a detecção em larga escala de genes diferencialmente expressos. A indicação de um gene como diferencialmente expresso pelo SAM é baseado na razão entre a diferença da média de cada situação experimental, no caso micélio e levedura, e no desvio padrão de cada gene calculado a partir das repetições experimentais.

Para a determinação de genes com mudanças significativas na expressão este programa utiliza um gráfico de dispersão de $d(i)$ versus a diferença relativa esperada $d_E(i)$. Para a grande maioria dos genes $d(i) = d_E(i)$, mas alguns genes são representados por pontos distantes da linha $d(i) = d_E(i)$. As alterações na expressão dos genes que se encontram a uma distância maior do que o limiar Δ são consideradas significativas. O limiar Δ determina dois cortes horizontais: no menor valor de $d(i)$ para que um gene seja considerado significativamente induzido, e no valor menos negativo de $d(i)$ para que um gene seja considerado significativamente reprimido.

A porcentagem de genes identificados por mudanças aleatórias é chamada de Taxa de Falsas Descobertas - FDR (*False Discovery Rate*), um método inicialmente

idealizado por Benjamini *et al.* (2001) e definido como a proporção esperada de rejeições falsas. O cálculo de FDR e o número de genes com mudanças significativas estão intimamente relacionados com o limiar Δ , de maneira que à medida que o Δ diminui, o número de genes significativamente alterados aumenta, mas ao custo de um aumento de FDR. Ao utilizar o SAM o usuário escolhe o limiar Δ mais conveniente com base no nível de significância estimado pelo FDR e o número de genes com os quais se pretende trabalhar. Neste trabalho, adotou-se um $FDR \leq 5$ o que representa uma confiabilidade de 95%, ou seja, a lista de genes diferencialmente expressos, quando comparados micélio e levedura, gerada neste trabalho tem 95% de confiabilidade. De fato, todos os genes identificados por este método, que foram validados por *northern blot* foram confirmados como diferenciais.

O SAM possui um fator para estimar a significância, chamado “*q-value*” (valor q), que é uma determinação para cada gene de menor FDR, que mede o quão significativo é a expressão diferencial de um determinado gene. Os genes que apresentaram um valor $q \leq 0,05$ (5%) foram considerados diferencialmente expressos neste trabalho.

4.13.8 - Deposição dos dados

Atualmente, as informações sobre microarranjos e ferramentas utilizadas nas análises dos dados são depositadas no MIAME (*Minimal Information About Microarray Experiment*) (Brazma & Vilo, 2001). O MIAME é um padrão proposto para a representação dos dados de tal forma que os leitores de artigos publicados possam reproduzir o experimento. Tem como objetivo padronizar a descrição do experimento de microarranjos de DNA e favorecer o desenvolvimento de métodos da análise eficientes (www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame_checklist.html). Estes objetivos podem ser atingidos com uma descrição adequada dos experimentos, dos materiais e métodos utilizados, assim como, a criação de uma página relativamente simples com dados suplementares (imagens originais, dados da quantificação) ou a submissão destas informações a um dos repositórios públicos [*ArrayExpress* (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) ou GEO (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)].

4.14 - Northern blot

Para o experimento de *northern blot*, 15µg de RNA total extraído de células de micélio e levedura de *P. brasiliensis* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,5% e transferido por capilaridade para uma membrana de *nylon Hybond-N* (*GE Healthcare*). As sondas foram marcadas com o radioisótopo $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP utilizando o kit - *Random Priming Procedure* (*Invitrogen*), conforme instruções do fabricante. As membranas foram primeiramente incubadas em solução de pré-hibridação (50% formamida; 4x SSPE; 5x solução de Denhardt's; 0,1% SDS, acrescida de DNA de esperma de Arengue 100 µg/ml) durante 2 horas a temperatura de 42°C. A marcação foi feita utilizando a solução de hibridação (50% formamida; 4x SSPE; 5x solução de Denhardt's; 0,1% SDS), contendo a sonda radioativa (desnaturada a 100°C durante 5 minutos), a temperatura de 42°C, durante a noite. As membranas foram lavadas (2x SSPE e 0,1% SDS) a 65°C por 1 hora. As imagens foram obtidas utilizando o *Typhoon 9210 Phosphor Image* (*GE Healthcare*) e visualizadas pelo *Programa Image Quant*.

4.15 – Diferenciação celular em concentrações variadas de enxofre inorgânico

As condições de cultivo para este experimento foram estabelecidas com base na composição do meio MVM (*McVeigh and Morton's Medium* – Restrepo & Jimenez, 1980), onde alguns componentes foram alterados. O enxofre inorgânico nas concentrações de 0mM, 8mM, 12mM e 17mM foram utilizadas neste experimento. O sulfato de amônio (30mM) presente na composição do meio original, foi substituído por cloreto de amônio nas concentrações de 30mM, 14mM, 6mM e 0mM respectivamente. O sulfato de magnésio (2mM) foi totalmente substituído por cloreto de magnésio (2mM) conforme especificado na tabela abaixo para um volume final de 100 ml:

Concentração Sulfato de Amônio	Sulfato de Amônio	Sulfato de Magnésio (2mM)	Cloreto de Magnésio(2mM)	Cloreto de Amônio
0 mM	X	X	0,04g	0,16g (30mM)
8 mM	0,106g	X	0,04g	0,075g (14mM)
12 mM	0,159g	X	0,04g	0,032g (6mM)
17 mM = MVM/100ml	0,2g	0,05g	X	X

Uma vez estabelecidas as condições para o cultivo, células de micélio (0,1g peso úmido) e de levedura ($2,5 \times 10^7$ células), previamente crescidas em meio MVM normal, foram coletadas, lavadas e inoculadas em 100ml de meio MVM modificado para as concentrações de enxofre inorgânico anteriormente estabelecidas. Estas culturas foram incubadas, sob agitação a 120 rpm a 22°C para a diferenciação de micélio em levedura e a 36°C para a diferenciação inversa. A cada 24 horas, foram coletados 100µl de cada frasco (em triplicata), as células foram contadas ao microscópio óptico com o auxílio da câmara de *Neubauer* e a viabilidade celular verificada utilizando o corante Verde Janus (*Sigma*). A diferenciação celular foi acompanhada através da contagem do número de células leveduriformes presente nas respectivas culturas. A concentração de enxofre inorgânico no ponto 0mM foi de 8 µM devido a presença dos elementos traços ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 15,7 mg/l; $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 140,4 mg/l; $\text{MnSO}_4 \cdot 14\text{H}_2\text{O}$ 8,1 mg/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 79,2 mg/l) no meio de cultura.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Análise global dos genes identificados no transcriptoma de *P. brasiliensis*.

Um total de 25.598 ESTs derivadas de bibliotecas não normalizadas de cDNA, das formas de micélio e levedura, foram seqüenciadas no transcriptoma de *P. brasiliensis*. Os clones de cDNAs foram geradas tanto a partir da amplificação dos fragmentos, clonados no fago λ ZAPII por PCR, quanto a partir de fagomídeos excisados e em seguida seqüenciados. Os fragmentos selecionados apresentaram tamanhos que variaram de 0,5 a 2,5 Kb, correspondendo à região 5'. Do total, 19.718 seqüências de alta qualidade (9.777 de levedura e 9.941 de micélio) com PHRED \geq 20 foram agrupadas pelo programa CAP3, o qual forneceu 2.655 *contigs* e 3.367 *singlets*. Os 6.022 grupos resultantes, denominados de PbAESTs (*P. brasiliensis* - *Assembled Expressed Sequence Tags*), representam genes expressos em *P. brasiliensis*. Destas 6.022 PbAESTs, somente 84 já haviam sido relatadas anteriormente. O número de genes ortólogos em outros fungos foi de 4.130 (68,3%), sendo que 3.186 (52,9%) são genes ortólogos de *A. nidulans*, os quais refletem uma proximidade filogenética entre este fungo filamentoso e o *P. brasiliensis*. Descontando o número de ortólogos em bactérias (43 ou 0,4%) e outros eucariotos (25 ou 30,6%), um total de 1.824 (30,6%) constituem potenciais novos genes, ainda não descritos, os quais provavelmente são únicos neste organismo, pois nenhuma homologia foi reportada até o momento (Fig. 2A e Anexo 1 – Tabela 1 suplementar).

Para inferir possíveis funções, os 6.022 genes descritos no transcriptoma foram anotados e 18 categorias foram identificadas. A Figura 2B mostra 12 destas categorias destacando-se: metabolismo celular (29%); transcrição (12%); síntese de proteínas (10%); processamento e endereçamento de proteínas (9%); energia (9%); ciclo celular e processamento de DNA (8%); transporte celular (5%); transporte de íons e macromoléculas (5%); comunicação celular e mecanismos de transdução de sinal (4%); controle da organização celular (4%); reparo celular, defesa e virulência (3%) e destino celular (2%). Vale ressaltar que a maioria dos genes anotados na categoria de transdução de sinal e vias de comunicação celular foram correlacionadas com a diferenciação celular em outros fungos patogênicos e dimórficos.

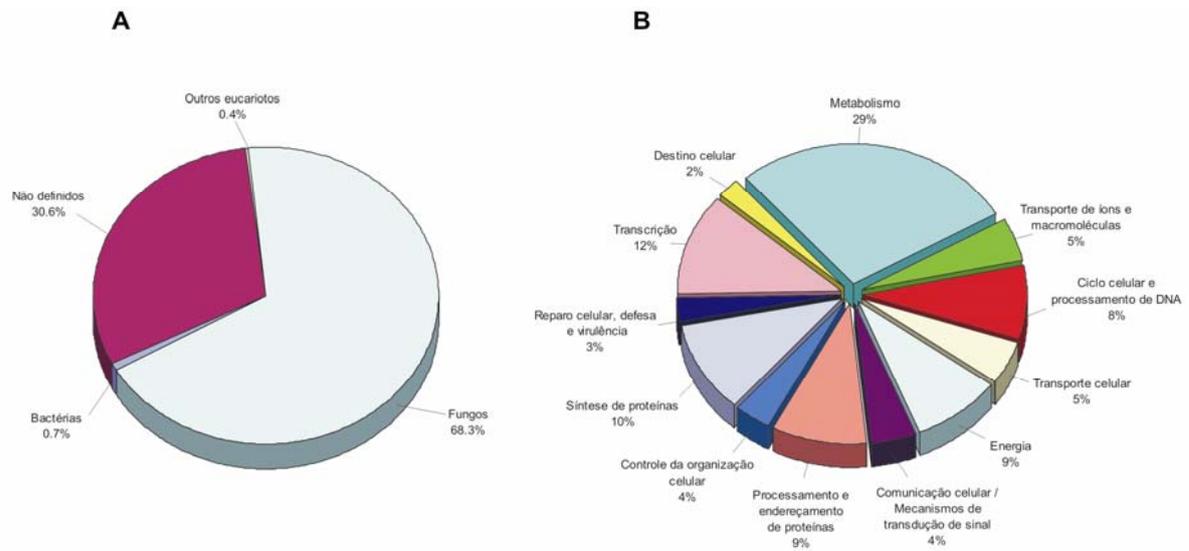


Figura 2. Classificação funcional dos genes identificados no transcriptoma do *P. brasiliensis*. A - Distribuição da melhor homologia - BLASTX (E-value 10^{-10}). B - Categorias funcionais das PbaESTs usando a classificação pelo MIPS.

A simulação de dois modelos comparando a evolução do número total de ESTs seqüenciadas no projeto e o número de grupos formados por estas seqüências foram usados para a análise do transcriptoma. O primeiro modelo assume que todos os mRNAs são igualmente representados na célula, enquanto o segundo, mais próximo do modelo biológico, assume que metade da massa de mRNAs corresponde a 10% dos transcritos totais, e a outra metade é responsável pelos 90% dos transcritos restantes. Os resultados obtidos se aproximam mais do segundo modelo (Fig. 3), sugerindo fortemente que o transcriptoma represente cerca de 80% de todo o conteúdo gênico estimado para *P. brasiliensis*, confirmando a estimativa de Reinoso *et al.* (2005) de que este patógeno possuiria cerca de 7.500 a 9.000 genes.

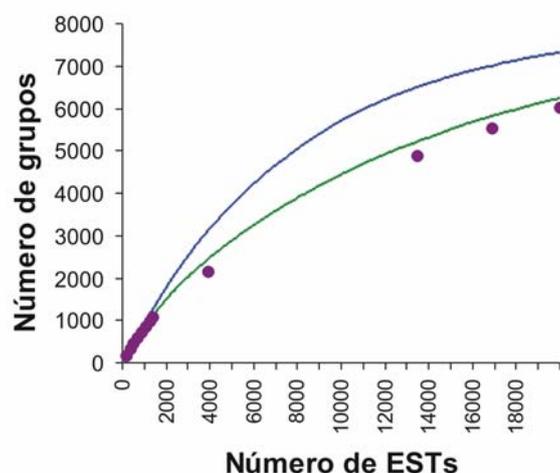


Figura 3. Evolução do número de grupos de acordo com o aumento do número de seqüências. Os pontos correspondem ao aumento do número de clones seqüenciados ao longo do projeto. A linha azul indica o transcriptoma virtual, considerando o mesmo nível de expressão para cada transcrito. A linha verde corresponde ao segundo modelo, considerando um conjunto de genes altamente expressos e outro conjunto de genes menos expressos. Ambas as simulações consideraram um número total de 8.000 genes.

5.1.1 – Genes super expressos presentes no transcriptoma de *P. brasiliensis*

A análise do transcriptoma mostrou a detecção de 27 genes super expressos em *P. brasiliensis*. Para esta seleção foram considerados todos os *contigs* formados por no mínimo 50 ESTs (Anexo 1 – tabela 2 suplementar). Como pode ser visto nesta tabela, os três genes (*M51*, *M32* e Hidrofobina 1-*Pbhyd1*), identificados anteriormente por DDRT-PCR (Venâncio *et al.*, 2000), apresentaram também uma alta representatividade pela análise do transcriptoma, corroborando estes dados anteriores. Com 657 e 308 ESTs seqüenciadas, os genes *M51* e *M32* foram considerados, respectivamente, o primeiro e o terceiro gene mais expressos no transcriptoma. Para o gene *M51*, apenas pequenas seqüências representando uma fase aberta de leitura (ORF) foram observadas (Silva Jr. 2000), mas nenhuma conclusão a respeito deste gene foi elucidada até o momento, uma vez que não foi observada qualquer similaridade (nucleotídeo ou aminoácido) em banco de dados para esse transcrito altamente abundante da fase miceliana de *P. brasiliensis*.

Com relação ao *M32* foi relatado um tamanho de 1,3 kb e uma ORF de 918 pb (Baptista 2004). A seqüência da proteína deduzida é composta por dois conjuntos de

repetições que chegam a compor 2/3 da seqüência de aminoácidos, possuindo ainda uma região amino-terminal hidrofóbica, sugerindo a presença de um peptídeo-sinal. A estrutura secundária predita para esta proteína apresentou uma estrutura do tipo ANK (Ankirina): duas α -hélices seguidas por uma alça em grampo β . A Ankirina representa uma família ubíqua de proteínas adaptadoras intracelulares envolvidas na ligação de diversas proteínas a domínios especializados de membrana. São encontradas na membrana plasmática e na membrana do retículo endoplasmático (Bennett & Baines, 2001). Compreende um domínio de ligação a membrana composto de 24 repetições do tipo ANK, um domínio de ligação a espectrina, um domínio de ativação da via das caspases e um domínio C-terminal (Mohler *et al.*, 2002), sendo responsáveis por mediar interações proteína-proteína (Rubtsov & Lopina, 2000). No entanto, como já relatado anteriormente, estes dois genes (*M51* e *M32*) não apresentam nenhuma similaridade com nenhuma outra seqüência depositada nos bancos de dados, sugerindo fortemente que correspondam a novos genes ainda não descritos.

Para o gene *Pbhyd1*, um total de 56 ESTs foram seqüenciadas. As hidrofobinas são pequenas proteínas, de cerca de 100 resíduos de aminoácidos, exclusivamente secretadas por fungos filamentosos. Apresentam como assinatura, a presença de oito resíduos de cisteína e um padrão de espaçamento entre regiões hidrofílicas e hidrofóbicas bastante conservadas (Wessels, 1996). Permitem aos fungos escaparem do seu ambiente aquoso e se dispersarem por novos ambientes, estando envolvidas na formação de estruturas aéreas como hifas, esporos e corpos de frutificação, conferindo hidrofobicidade a essas estruturas (Van Wetter *et al.*, 2000). Além disso, as hidrofobinas parecem interceder a adesão de hifas a superfícies hidrofóbicas, desencadeando sinais importantes para as etapas iniciais de invasão ao hospedeiro (Talbot *et al.*, 1996), o que pode explicar a super expressão deste gene em micélio de *P. brasiliensis* (Albuquerque *et al.*, 2004).

Com 413 ESTs e uma identidade de 100% com o ortólogo de *E. nidulans*, o gene que codifica para formamidase é o segundo descrito como super expresso em levedura de *P. brasiliensis*. A formamidase é responsável por mediar a hidrólise específica da formamida para produzir formato e amônia. Esta enzima é responsável, em fungos, pela detoxificação da formamida permitindo sua utilização como fonte de nitrogênio (Frase *et al.*, 2001). Acredita-se que a amônia desempenhe um papel central na patogênese de outros organismos como em *Helicobacter pylori* (Igarashi *et al.*, 2001). Provavelmente em *P. brasiliensis* a formamidase esteja relacionada à função de degradação de

formamida, visando a utilização do nitrogênio para o crescimento e viabilidade deste patógeno na natureza. Borges *et al.* (2005) isolaram e clonaram o cDNA da formamidase para a expressão heteróloga e análise funcional da proteína recombinante, verificando a presença de uma formamidase cataliticamente ativa em *P. brasiliensis*. Estes dados sugerem que este gene seja um potencial antígeno para estudos sorológicos ou mesmo em estudos da interação patógeno-hospedeiro na PCM.

O gene *Pby20* (115 ESTs seqüenciadas) codifica uma proteína super expressa na fase de levedura, a qual apresenta alta similaridade com uma flavodoxina, uma proteína membro da família WrbA (*tryptoplan (W) repressor-binding protein*) que tem sido caracterizada como enzima envolvida na detoxificação de espécies reativas de oxigênio. Este fato sugere que a PbY20 provavelmente exerça esta função, protegendo este fungo contra o estresse oxidativo causado pelos macrófagos, neutrófilos e outras células fagocitárias durante o processo de infecção humana (Daher *et al.*, 2005 – Anexo 8).

Dentre os genes que apareceram com maior freqüência no transcriptoma, encontra-se um ortólogo ao gene *mold-specific* – MS8 de *H. capsulatum* com 99 ESTs seqüenciadas em *P. brasiliensis* super expresso em micélio. Este gene codifica uma proteína de 21 kDa rica em glicina e glutamina e encontra-se altamente expresso na forma miceliana de *H. capsulatum*. Tian & Shearer (2002) mostraram a formação de hifas defeituosas em mutantes nocauteados para este gene em *H. capsulatum*.

A via biossintética do ergosterol é a mais utilizada como alvo na terapia antifúngica atual. O produto final desta via é o ergosterol, uma molécula exclusiva de células fúngicas e principal constituinte da membrana citoplasmática. Além disso, algumas enzimas desta via não estão presentes em células humanas, o que as tornam importantes alvos para diferentes classes de antifúngicos (Wills *et al.*, 2000; Odds *et al.*, 2003; Onyewu *et al.*, 2003). Anfotericina B, da classe dos polienos, interage diretamente com o ergosterol, mas não com o colesterol produzido pelas células de mamíferos (Odds *et al.*, 2003). Já os azóis usam como alvos enzimas da via biossintética do ergosterol, especialmente a citocromo P450 lanosterol 14-demetilase. Esta enzima, codificada pelo gene *Erg11*, apresenta uma porção de ferro protoporfirina no centro ativo onde a droga se liga, impedindo a demetilação do lanosterol, resultando na síntese defectiva ou mesmo na depleção do ergosterol (Smith & Edlind, 2002; Odds *et al.*, 2003; Theis & Stahl, 2004). Análise do transcriptoma mostrou que o gene *Erg11* encontra-se super expresso (71 ESTs) na forma de levedura em *P. brasiliensis*

O gene citocromo c oxidase (*cox*) codificado no genoma mitocondrial, pertencente à cadeia de transporte de elétrons e responsável pelo aumento de prótons no espaço intermembrana da mitocôndria, também encontra-se super expresso em levedura (54 ESTs). As proteínas codificadas no genoma mitocondrial têm sido relatadas como participantes importantes nos mecanismos relacionados ao processo de infecção causado por microrganismos patogênicos. Em *C. neoformans* a análise do perfil transcricional por DDRT-PCR em diferentes condições de crescimento, como à temperatura de 30°C, a temperatura fisiológica de 37°C e na condição de infecção (coelhos imunocomprometidos), revelou que o transcrito *cox1* foi detectado como sendo diferencialmente expresso na temperatura de 37°C bem como na condição de infecção (Rude *et al.*, 2002). Desta forma, genes mitocontriaais provavelmente auxiliam a sobrevivência do patógeno promovendo uma melhor interação com o hospedeiro.

Outro gene relatado como super expresso é o gene que codifica um transportador de alta afinidade por cobre (*hight affinity copper transport protein*), do qual 50 ESTs foram seqüenciadas. O íon cobre é essencial para todos os organismos e atua como importante co-fator em muitos processos celulares como respiração celular, transporte de ferro, produção de energia e proteção contra o estresse oxidativo atuando juntamente com citocromo c oxidase, a Cu-Zn 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. Em *P. brasiliensis*, a super expressão deste gene em levedura provavelmente está relacionado à infecção e sobrevivência deste patógeno no interior de células fagocitárias, as quais apresentam-se como um ambiente nutricionalmente pobre e de estresse oxidativo.

Além destes genes, a super expressão do gene que codifica uma chaperona de baixa massa molecular (HSP30) também foi encontrado. Este gene está envolvido na proteção contra diversos tipos de estresse. Em *S. cerevisiae* esta chaperona encontra-se integrada a membrana plasmática e parece diminuir a atividade ATPase depende de prótons em condições de estresse, podendo participar inclusive na resistência a drogas (Piper *et al.*, 1997).

Nesta mesma tabela, 9 genes considerados super expressos, envolvidos na síntese de proteínas, evidenciam a alta atividade de síntese protéica na condição utilizada para extração de RNA e construção dos bancos de cDNA seqüenciados no transcriptoma. A análise de todos os genes super expressos descritos acima pode

apontar para alguns mecanismos comuns capazes de ajudar na compreensão dos mecanismos de patogenicidade de *P. brasiliensis*, os quais deverão ser comprovados pela metodologias de análise da função gênica (ruptura gênica ou RNAi).

5.1.2 – Genes envolvidos em alguns processos biológicos de relevância para o entendimento da biologia do *P. brasiliensis*.

A combinação das informações fornecidas pela análise MIPS das 6.022 genes, sugerindo funções putativas, motivos e seqüências homólogas auxiliaram na proposição e entendimento biológico de *P. brasiliensis*. Neste trabalho (Anexos 1, 2 e 4) uma análise global dos genes anotados no transcriptoma foi realizada. Serão discutidos nesta tese apenas alguns destes processos, tais como virulência, alvos para drogas, genes envolvidos na interação patógeno-hospedeiro, vias de transdução sinal, MDR, HSP e estresse oxidativo.

Virulência e alvos para drogas

A virulência fúngica é descrita como um evento altamente complexo, resultante da expressão de múltiplos genes em diferentes estágios da infecção. As etapas de adesão e a sobrevivência do patógeno no interior do hospedeiro mostram-se essenciais no estabelecimento da patogênese. Nesse contexto, fatores importantes para o estabelecimento da infecção por fungos patogênicos vêm sendo descritos embora, apenas recentemente os mecanismos genéticos e moleculares envolvidos na expressão desses genes de virulência começaram a ser investigados (Kwon-Chung, 1998; Odds *et al.*, 2001; Yang, 2003). O conceito de virulência tem mudado a fim de incorporar também fatores do sistema imune do hospedeiro, uma vez que evidências experimentais têm demonstrado que a virulência pode ser atenuada quando o patógeno infecta indivíduos imunocompetentes. Desta forma, a virulência está relacionada a atributos microbianos e a suscetibilidade do hospedeiro (Casadevall *et al.*, 2001).

O protocolo padrão utilizado na identificação de fatores potenciais de virulência envolve a inativação de genes potenciais de virulência específicos (mutagênese sítio-dirigida, ruptura gênica, RNAi) que permite o estudo de cepas mutantes específicas, e a correspondente cepa reconstituída, em modelo de infecção animal. Baseando-se nisto, Falkow (2004) definiu que para um gene ser considerado de virulência, a infecção ou

patogênese causada pelo mutante deve ser atenuada quando comparada à infecção causada pelo tipo selvagem e pela cepa reconstituída. Esse conceito ficou conhecido como “Postulado de Falkow”. Uma das principais etapas que visam ao melhor entendimento das bases moleculares da interação patógeno-hospedeiro relaciona-se à identificação dos genes de virulência do organismo patogênico. A análise do transcriptoma de *P. brasiliensis* permitiu a identificação de 27 ortólogos relacionados a genes descritos e comprovados como sendo fatores de virulência em *C. albicans*, *C. neoformans* e *A. fumigatus* segundo o “Postulado de Falkow” (Anexo 1 e Tavares *et al.*, 2005). Estes genes foram sub-divididos em 4 classes: metabolismo, síntese de parede celular, transdução sinal e outros determinantes de virulência (Anexo 1 – tabela II). Muitos destes genes são considerados também importantes alvos para drogas e encontram-se listados na tabela III do Anexo 1.

Em relação aos genes de virulência relacionados ao metabolismo, 8 genes foram encontrados no transcriptoma, destacando os que codificam para: *mnt* (α -1,2-manosiltransferase) - síntese de lipídio, o *hem3* - metabolismo da glicose, *pabaA* - síntese de purinas e os genes que codificam para as enzimas *icl1* e *mls1* do ciclo do glioxilato. A importância das enzimas isocitrato liase (*icl1*) e malato sintase (*mls1*) foi descrita na virulência de alguns patógenos intracelulares, como *Mycobacterium tuberculosis* e *C. albicans* (Finlay & Falkow, 1997; Lorenz & Fink, 2001). A ativação destas enzimas mostrou-se aumentada nestes patógenos após fagocitose. Ainda, em modelo murino de infecção, mutantes de *C. albicans* para o gene *icl1* tiveram seu caráter virulento extremamente reduzido, fortalecendo a correlação entre o papel deste gene na virulência do fungo (Lorenz & Fink, 2001; Schnappinger *et al.*, 2003). Em *P. brasiliensis*, ortólogos aos genes *icl1* e *mls1* de *C. albicans* são apontados como fortes candidatos a fatores de virulência, já que *P. brasiliensis*, por apresentar-se como um patógeno intracelular facultativo, também deve utilizar mecanismos que permitam sua sobrevivência no interior dessas células fagocitárias. Estas enzimas não foram encontradas em humanos, o que as tornam um excelente alvo para o desenvolvimento de drogas antifúngicas, embora com a restrição da sua citolocalização (glioxissomo) o que deve dificultar o acesso e ação de drogas.

A parede celular, essencial para a viabilidade de microrganismos, pode ser descrita como uma das principais diferenças entre células de mamíferos e células de fungos. Enzimas relacionadas à sua biossíntese são consideradas alvos para drogas antifúngicas, além de estarem correlacionadas com a virulência do organismo

(Selitrennikoff & Nakata, 2003). Em *P. brasiliensis*, a composição da parede celular varia entre as diferentes formas sendo que levedura possui uma maior quantidade de quitina (37 a 48%) quando comparada a micélio (7 a 18%). O aumento significativo na quantidade de quitina em levedura de *P. brasiliensis* permite supor que enzimas relacionadas a biossíntese deste componente da parede celular são potenciais fatores de virulência desse fungo. Esse fato foi confirmado em *C. albicans*, para o qual mutantes para o gene da quitina sintase 3 (*chs3*) apresentam virulência atenuada (Bulawa *et al.*, 1995). No transcriptoma de *P. brasiliensis* foi identificado um gene homólogo ao gene *chs3*, além de outras enzimas da via de síntese de quitina. Outros ortólogos de *C. albicans* críticos para a composição da parede celular, adesão e virulência fúngica (Gozalbo *et al.*, 2004) como, por exemplo, glucoquinase-6-fosfato acetiltransferase (*gna1*), manosiltransferase (*pmt1*), glicosidases *Phr1p* e *Phr2p* e α -1,2 manosiltransferase (*mnt1*) também foram identificados. Em *C. albicans* o gene α -1,2 manosiltransferase inativado demonstrou uma reduzida habilidade de adesão em células humanas epiteliais bucal e na vaginal de ratos. Além disso, uma reduzida capacidade de virulência foi observada em camundongos e cobaias, estando esse fato associado com a perda na capacidade de colonizar determinados órgãos (Burman *et al.*, 1998). A enzima glicosamina-6-fosfato acetiltransferase é codificada pelo gene *gna1*. Essa enzima catalisa um dos passos da síntese de UDP-N-acetilglicosamina, um precursor de quitina e glicoproteínas em fungos, sendo essencial para biossíntese da parede celular. A inativação dessa enzima em *C. albicans* resultou na total perda da capacidade desse fungo causar doença em camundongos (Mio *et al.*, 2000). Um efeito semelhante pode ser obtido por meio da inativação da atividade catalítica dessas enzimas em *P. brasiliensis*.

Postula-se que o fagossomo, além de ser um ambiente de carência nutricional, apresenta condições extremas de estresse oxidativo devido às altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) produzidas, o que exige mecanismos de adaptação dos patógenos intracelulares (Graham *et al.*, 1999; Schnappinger *et al.*, 2003). Genes que permitem a sobrevivência de microrganismos no interior de células fagocitárias, atenuando os efeitos deletérios causados pela exposição do patógeno a uma variedade de substâncias geradas via NADPH oxidase (EROs), e pela óxido nítrico sintase (ERNs), são fortemente associados a prováveis fatores de virulência (Nathan & Shiloh, 2000; Missall *et al.*, 2004). Desta forma, a produção de ERNs representa um mecanismo fungicida relevante de macrófagos ativados no

combate a *P. brasiliensis*. Já o papel de EROs na proteção contra a PCM não está claro, uma vez que o fungo mostra-se resistente ao tratamento com EROs *in vitro* (Schaffner *et al.*, 1986; Brummer *et al.*, 1988; Dantas, *in preparation*). Uma possível explicação para esse relato é a presença de um sistema eficiente de neutralização dos produtos gerados pela NADPH oxidase em *P. brasiliensis*. Análises do transcriptoma desse fungo permitiram identificar ortólogos a genes de virulência relacionados a detoxificação de radicais de oxigênio e nitrogênio, como Cu/Zn superóxido dismutase (*sod1*), catalase (*cat1*) e oxidase alternativa (*aox1*), dentre outros (Anexo 1 – tabela II). A ação protetora da atividade dessas enzimas vem sendo relatada em diversos fungos, como *C. albicans* e *C. neoformans* (Hwang *et al.*, 2002; Akhter *et al.*, 2003; Cox *et al.*, 2003). Isolados mutantes para o gene *sod1* de *C. albicans* e *C. neoformans* apresentaram virulência atenuada, ressaltando a importância dessa enzima no processo de adaptação e estabelecimento da infecção (Hwang *et al.*, 2002; Cox *et al.*, 2003).

Outros fatores como as enzimas hidrolíticas, proteinases e fosfolipases, também parecem ser importantes na virulência de fungos patogênicos. Estas enzimas quando secretadas permitem o rompimento de membranas celulares do hospedeiro e da matriz extracelular, facilitando a disseminação e a invasão dos tecidos pelo microrganismo. As fosfolipases representam um grupo heterogêneo de enzimas que possuem a habilidade de hidrolisar uma ou mais ligações éster de glicerofosfolípídeos. Apesar de todas as fosfolipases terem fosfolípídeos como substrato, cada enzima cliva uma ligação éster específica. Dessa maneira, há quatro tipos de fosfolipases (A, B, C e D) sendo todas envolvidas na virulência de vários patógenos bacterianos e fúngicos (Winkler & Daugherty, 1989; Silverman *et al.*, 1992; Saffer & Schwartzman, 1991; Ghannoum, 2000). Dentre essas, destaca-se a fosfolipase B (*PLB1*), cujo ortólogo do gene de *C. albicans* foi encontrado no transcriptoma de *P. brasiliensis*. A fosfolipase B, diferentemente da A, C e D, além da atividade de hidrolase, possui também atividade de lisofosfolipase-transacilase (LPTA) sendo requerida para disseminação e estabelecimento das infecções experimentais pelos fungos patogênicos *C. albicans* e *C. neoformans* (Leidich *et al.*, 1998; Cox *et al.*, 2001). Ibrahim *et al.* (1995) demonstraram que isolados de *C. albicans*, com alta atividade de PLB mostraram-se mais virulentos em modelo de infecção murino, enquanto que mutantes ($\Delta plb1$) tiveram sua virulência significativamente atenuada quando comparados ao tipo selvagem e ao mutante reconstituído. Esses resultados demonstram a importância do gene *plb1* para o estabelecimento da infecção (Leidich *et al.*, 1998; Mukherjee *et al.*, 2001). O papel da

fosfolipase B como um fator de virulência também foi relatado para *C. neoformans* (Santangelo *et al.*, 1999; Cox *et al.*, 2001). Considerando-se o fato de que a PCM é caracterizada pela disseminação fúngica, com o envolvimento de qualquer órgão ou sistema (Brummer *et al.*, 1993; Franco *et al.*, 1993), o desenvolvimento de drogas que inibam a produção, secreção ou atividade enzimática das fosfolipases restringiria a infecção pelo *P. brasiliensis* favorecendo o tratamento e o controle dessa micose.

Além destes genes, outro potencial fator de virulência identificado no transcriptoma de *P. brasiliensis* corresponde ao gene da urease (*ure*), enzima que catalisa a hidrólise da uréia, gerando dióxido de carbono (CO₂) e amônia (NH₃). A urease vem sendo também descrita como fator de virulência em *C. neoformans* e *Coccidioides posadasii*, para os quais foi mostrado que camundongos infectados com mutantes para o gene *ure1* apresentam menor taxa de mortalidade quando comparados aos animais infectados com o tipo selvagem (Cox *et al.*, 2000; Mirbod-Donovan *et al.*, 2006). Já a enzima urato oxidase ou uricase, também encontrado no transcriptoma de *P. brasiliensis*, constitui uma enzima da via da degradação das purinas responsável pela conversão de ácido úrico em alantoína e peróxido de hidrogênio e representa um poderoso captador de radicais livres. Esta enzima tem um papel importante na proteção do patógeno durante a ingestão por macrófagos e não está presente em humanos (Ames *et al.*, 1981; Whiteman & Halliwell, 1996), sendo um forte candidato para o desenvolvimento de drogas.

Dentre as enzimas fungo-específicas encontrados no transcriptoma e que constituem excelentes alvos para o desenvolvimento de drogas antifúngicas estão: ERG6 ($\Delta(24)$ Esterol C-Metiltransferase), no qual a ruptura do gene provoca aumento de resistência fúngica aos compostos poliênicos e diminuição do conteúdo celular de ergosterol em *C. albicans* e *S. cerevisiae*; o gene envolvido na biossíntese de esfingolipídios que codifica uma proteína de resistência ao antibiótico aureobasidina (AUR1); o fator de alongação da tradução 3 (eEF-3), necessário para a biossíntese de proteínas.

Interação patógeno-hospedeiro

A importância das enzimas hidrolíticas na infecção causando danos a célula hospedeira e fornecendo nutrientes ao patógeno em um ambiente inóspito têm sido cada vez mais estudado (Schaller *et al.*, 2000). Provavelmente as proteinases representem o melhor conjunto de enzimas envolvidas na patogenicidade fúngica. Em *P. brasiliensis*

uma proteinase extracelular serina dependente, característica da fase de levedura cliva os principais componentes da membrana basal *in vitro* descrita como importante para a disseminação fúngica (Puccia *et al.*, 1999). O nosso grupo caracterizou o gene *Kex2* de *P. brasiliensis* que codifica uma proteína, provavelmente localizada no Golgi e potencialmente envolvido no dimorfismo (Venâncio *et al.*, 2000 – Anexo 9) e o gene *ClpB*, o qual apresenta homologia com uma protease induzida pela temperatura e diferencialmente expressa na forma de levedura (Jesuino *et al.*, 2002).

A adesão de microrganismos patogênicos ao tecido do hospedeiro tem sido considerada a primeira e principal fase da colonização e disseminação do parasita e exerce um papel crucial na infecção. A análise do transcriptoma mostrou a identificação de 22 prováveis genes envolvidos na interação patógeno-hospedeiro descritos em outros organismos e ortólogos em *P. brasiliensis* (tabela 2 – Anexo 4). Dentre estes genes destacam-se: i) os genes com função na resposta a antioxidantes, catalase P e catalase A, que são responsáveis pela proteção dentro do hospedeiro e requeridos para o crescimento do patógeno no interior de macrófagos; ii) as HSPs, hsp60 e hsp70, descritas como importantes para a adesão ao macrófago e como antígenos para diagnóstico; iii) genes do metabolismo de aminoácidos, 3-isopropil-malato desidrogenase (*leu 2*), super regulado em *C. albicans* durante a infecção; iv) metabolismo da glicose, trealose-6-fosfato sintase (*tps1*), envolvida na produção de hifas em *C. albicans*, enolase (*eno*), proteína imunossupressora em *Streptococcus sobrinus*, triosefosfato isomerase (*tip*) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gapdh*), que codificam proteínas presentes na parede celular de *C. albicans*; v) entre outros (metabolismo da amônia, síntese de lipídeos, proteínas associadas a parede celular, fatores de secreção), todos envolvidos na colonização e manutenção do hospedeiro.

Vias de transdução sinal

A anotação do transcriptoma revelou componentes putativos das vias de sinalização no *P. brasiliensis* (Figura 4 e tabela 8 suplementar - Anexo 1) como a via MAPK (*mitogen activator protein kinases*), que teria participação na sinalização para a integridade celular, construção da parede, ferormônio/acasalamento e regulação osmótica. A via do cAMP/PKA (adenosina monofosfato cíclica/proteína quinase), que provavelmente atuam regulando a diferenciação celular de fungos e a via Ca^{2+} /calmodulina, a qual esta relacionada com a sobrevivência celular em condições de estresse tais como: oxidativo, altas temperaturas e alterações de membrana e parede

celular. Análise funcional da calmodulina do *P. brasiliensis* revelou que drogas que bloqueiam quinases dependentes de Ca^{2+} /calmodulina inibem a transição de micélio para levedura (Carvalho *et al.*, 2003).

A proteína quinase A/cAMP é uma cascata conhecida como reguladora da diferenciação fúngica e virulência. Dos genes identificados em *P. brasiliensis* foi encontrado um homólogo a vários adenilato ciclases fúngicas, uma cAMP fosfodiesterase codificada pelo gene *Pde10*, homólogos das subunidades catalíticas e regulatórias da proteína quinase A, que está envolvida na regulação da floculina encontrada na superfície celular (Flo 11p/Muc 1p). Paris & Duran (1985) demonstraram que a adição de cAMP, durante a transição de micélio para levedura inibiu a formação de filamentos, sugerindo que a via cAMP-PKA esteja envolvida no processo de dimorfismo deste patógeno.

Uma seqüência homóloga ao gene *Ras*, sugerindo a possibilidade de uma interação entre estas vias, também foi identificado no transcriptoma. Em vários outros fungos, patogênicos ou não, o *Ras* está envolvido na formação de filamentos, crescimento de pseudohifas/hifas e acasalamento (Mosch *et al.*, 1999). No entanto, tornam-se necessários mais estudos para elucidar sua função na transição de micélio-levedura e no mecanismo de patogenicidade. Foi também identificada Rho1p, uma pequena GTP ligada à proteína da subfamília Rho, que é requerida para o crescimento celular e para a regulação e formação da parede celular, por meio da síntese de β -1-3-glucana (Lengeler *et al.*, 2000). Ela também ativa PKC a qual regula a via da MAPK. Em *C. albicans*, RHO1 foi sugerida como alvo terapêutico para o controle da infecção deste patógeno (Roemer *et al.*, 2003).

MDR

A capacidade que os microrganismos possuem de sintetizar e secretar componentes tóxicos exerce um papel importante na sobrevivência das espécies. Há proteínas transmembrânicas (transportadores) envolvidas na captação de nutrientes e excreção celular. Em células cancerosas e em patógenos, particularmente em alguns fungos, algumas dessas proteínas são responsáveis por um importante fenômeno conhecido como “multi-resistência a drogas” (MDR - *Multi Drug Resistance*). Na análise do transcriptoma foram identificadas 20 ESTs correspondendo a genes que codificam proteínas de resistência a multi-drogas (MDRs) (Anexo 1 – tabela 9 suplementar e Anexo 6). Este fenótipo é descrito em vários organismos patogênicos e

tem grande importância na terapêutica de micoses humanas, uma vez que os mesmos estão envolvidos no mecanismo de resistência a drogas antifúngicas, atualmente um problema na área de saúde. Dentre os genes de MDR descritos destaca-se um homólogo ao gene MDR relatado em *C. albicans* (*mdr1*) que codifica para uma proteína que parece atuar como uma bomba de efluxo e que, provavelmente, esteja envolvido no mecanismo que torna este patógeno resistente ao tratamento com vários antifúngicos. A inativação deste gene leva este fungo a apresentar sensibilidade a várias drogas (Goldway *et al.*, 1995).

As proteínas de transporte exercem um importante papel fisiológico, transportando desde aminoácidos, açúcares, íons, lipídeos, co-fatores e outros substratos essenciais para os sistemas biológicos, por meio das estruturas das membranas biológicas. Como fonte de energia e relações estruturais, os sistemas de transporte podem ser divididos em 2 grupos principais: transportadores ativos primários e transportadores ativos secundários (transportadores com potencial eletroquímico). Há duas famílias de transportadores que utilizam ATP descritas: ATPases do tipo P, que fazem parte de uma superfamília de bombas que utilizam ATP no transporte transmembrana e transportadores ABC (“*ATP binding cassette*”). Os transportadores ABC são bastante encontrados e constituem uma das maiores superfamílias de transportadores, que possuem tanto transporte de efluxo, podendo inclusive secretar proteínas envolvidas na patogenicidade, quanto de captação (Saier Jr. 2000). A natureza química dos substratos captados pelos transportadores ABC é extremamente diversa, desde íons inorgânicos, açúcares e grandes polipeptídeos. No transcriptoma do *P. brasiliensis* foram encontrados 26 genes relacionados ao transporte de proteínas, sendo que 22 deles codificam proteínas do tipo transportadores ABC e 4 do tipo MFS (*Major Facilitator Superfamily*) (Anexo 1 – tabela 9 suplementar e Anexo 6). Entre os transportadores ABC destacam-se os ortólogos: CDR1 e CDR2 de *C. albicans*, PDR5 de *S. cerevisiae* e AtrF3 de *A. nidulans*. Todos estes genes são relatados em outros fungos por gerarem resistência a azoles, sendo potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas antifúngicas. Embora todos estes genes tenham sido encontrados no transcriptoma de *P. brasiliensis*, ainda não foi sistematicamente descrito o fenômeno de resistência a drogas para este fungo. Hahn *et al.* (2003) relataram um isolado de paciente com PCM resistente ao tratamento com cetoconazol, o que adverte para uma possível resistência deste patógeno a drogas.

HSP

As chaperonas moleculares ou proteínas de estresse foram primeiramente descritas como proteínas de choque térmico (HSPs: *Heat Shock Proteins*) e são super expressas principalmente em resposta ao aumento da temperatura. Outros parâmetros como estresse oxidativo (Moraitis & Curran, 2004), osmolaridade (Siderius *et al.*, 1997) e baixa temperatura (Kandror *et al.*, 2004) também induzem a expressão de chaperonas. São classificadas de acordo com a massa molecular em proteínas de alta (83 a 110 kDa); média (70 a 60 kDa) e baixa (8 a 35 kDa) massa molecular. As chaperonas estão envolvidas no dobramento e renaturação de proteínas e participam de vários processos celulares, incluindo dimorfismo celular em fungos e imunopatogenicidade de doenças infecciosas. Como a diferenciação celular em *P. brasiliensis* requer mudanças de temperatura, vários genes relacionados ao choque térmico foram identificados no transcriptoma (Nicola *et al.*, 2005). Um total de 437 ESTs (184 em micélio e 253 de leveduras), agrupadas em 48 genes, que codificam transcritos de chaperonas e co-chaperonas, foram encontrados no transcriptoma, tendo sido classificadas em famílias destacando-se: 3 chaperonas pequenas incluindo HSP30, 9 HSPs40, 10 HSPs60, 7 HSPs70, 9 HSPs90, 4 HSPs100, e 10 outras chaperonas. Calnexina, hsp60 citoplasmática (*cct7*) e a co-chaperona *sba1* apresentaram-se super expressas em células de micélio, enquanto as co-chaperonas *cpr1*, *hsp42*, *hsp60*, *hsp70* e *hsp90* apresentaram-se super expressas em células de levedura (Felipe *et al.*, 2005 - Anexo 1 – tabela 6 suplementar e Anexo 7). Destas, *hsp60* e *hsp70* foram anteriormente caracterizadas como diferencialmente expressas em levedura (Silva *et al.*, 1999; Salem Isacc *et al.*, 2000;). Em *P. brasiliensis*, o número total de ESTs relativos aos genes *heat shock* foi 38% maior em levedura do que em micélio, o que pode ser explicado, pois a fase leveduriforme está diretamente relacionada ao aumento da temperatura para 37°C.

Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes (Sies *et al.*, 1997). Pode ser causado por espécies reativas de oxigênio (ROS) como o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (HO) e peroxinitrito ($ONOO^-$) um produto da reação entre o superóxido e óxido nítrico (NO), os quais tem efeitos tóxicos através da produção de radicais livres. Análises do transcriptoma de *P. brasiliensis* permitiram identificar 23 ortólogos a genes

relacionados a detoxificação de radicais de oxigênio e nitrogênio (Anexo 1 – tabela 7 suplementar) como Cu/Zn Superóxido Dismutase (*sod*), Catalase (*cat*), Citocromo-c Peroxidase (*ccp*), Peroxiredoxina (*prx*), Tioredoxina Peroxidase (*trx*), Glutathione S-Transferase (*gst*), entre outros.

As enzimas superóxido dismutases (SODs) detoxificam o radical superóxido, gerando oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A remoção do radical superóxido é importante por impedir a subsequente formação de radical hidroxil e peroxinitrito, compostos altamente tóxicos para todas as macromoléculas biológicas (Babior, 2000; Missall *et al.*, 2004). O ânion superóxido é produzido em abundância pelas células fagocitárias, compreendendo a primeira espécie reativa de oxigênio gerada no fagossomo, o que demonstra a importância da enzima SOD para a sobrevivência de patógenos intracelulares (Fridovich, 1995). Pela subtração *in silico* e microarranjo de cDNA em *P. brasiliensis*, os genes superóxido dismutase (*SOD*) e catalase mostraram-se super expressos na forma de levedura, sendo este resultado confirmado por *northern blot*.

As catalases são enzimas que degradam o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado pela ação da superóxido dismutase em oxigênio e água (H_2O). Esse mecanismo de detoxificação de H_2O_2 parece ser um importante fator de proteção de bactérias e fungos contra o estresse oxidativo gerado por células fagocitárias do hospedeiro (Kawasaki *et al.*, 1997; Wysong *et al.*, 1998; Basu *et al.*, 2004). O papel protetor da catalase foi mostrado para *C. albicans*, na qual mutantes para o gene *cat1* tornaram-se mais sensíveis a ação de neutrófilos humanos, e avirulentas em modelo murino de infecção (Wysong *et al.*, 1998). Em *P. brasiliensis* uma catalase peroxissomal foi identificada e clonada (Moreira *et al.*, 2004). Foi verificado que os níveis dessa enzima são aumentados durante a transição de micélio para a levedura, e durante a exposição *in vitro* do microrganismo a H_2O_2 , sugerindo um possível papel da catalase na virulência de *P. brasiliensis*.

A enzima CcP (citocromo-c peroxidase) utiliza o citocromo-c como doador de elétrons para a redução de H_2O_2 à água no espaço mitocondrial intermembrana. O gene que codifica para esta enzima foi identificado no transcriptoma de *P. brasiliensis*. Adicionalmente, os genes que codificam para peroxiredoxina (*prx* e *trx*- tioredoxina peroxidase) e para a glutathione-S- transferase (*gst*) também foram relatados no transcriptoma e, como a CcP, estas enzimas anti-oxidantes provavelmente contribuem

para a resistência deste e de outros fungos patogênicos aos mecanismos microbicidas dependentes de oxigênio garantindo, desta forma, a sua sobrevivência.

Outro gene identificado no transcriptoma de *P. brasiliensis* e que parece estar relacionado à defesa antioxidante foi o *aox1*, que codifica uma oxidase alternativa. Essa enzima foi encontrada em muitos fungos patogênicos, incluindo *C. neoformans*, *C. albicans*, *H. capsulatum* e *A. fumigatus* (Huh & Kang, 1999 e 2001; Johnson *et al.*, 2003). A oxidase alternativa é enzima de uma via respiratória complementar que recebe elétrons diretamente da ubiquinona, reduzindo oxigênio em água, e produzindo aproximadamente um terço (1/3) de ATP, quando comparado à cadeia de transporte de elétrons. Permitindo assim a manutenção do fluxo de elétrons na membrana mitocondrial (Missall *et al.*, 2004). Foi demonstrado que mutantes de *C. neoformans* para o gene *aox1* apresentaram maior susceptibilidade ao estresse oxidativo *in vitro* e menor taxa de mortalidade em animais (murinos) infectados via inalação (Akhter *et al.*, 2003).

Em adição, ESTs que apresentam similaridades com os fatores de transcrição YAP1, HAP3 e SKN7 de *S. cerevisiae* envolvidos na indução do mecanismo de defesa contra estresse oxidativo, foram também identificados no transcriptoma.

5.2 - Análise de genes diferencialmente expressos no transcriptoma de *P. brasiliensis*, identificados por subtração *in silico* e microarranjos de cDNA

A habilidade de *P. brasiliensis* iniciar a infecção, invadir o tecido do hospedeiro e sobreviver perante suas defesas está provavelmente também ligada à indução de genes específicos, que tornam possível sua sobrevivência e o eventual estabelecimento da infecção. A expressão diferencial de genes é essencial para os processos patológicos e a sua identificação leva ao melhor entendimento dos mecanismos moleculares da patogênese. No intuito de identificar genes diferencialmente expressos em micélio e levedura de *P. brasiliensis*, cultivados *in vitro*, duas metodologias (subtração *in silico* e microarranjos de cDNA) foram empregadas.

Genes diferencialmente expressos por subtração *in silico*

Todos os 2.655 *contigs* gerados no transcriptoma foram analisados pela subtração *in silico*, sendo cada *contig* (gene expresso) caracterizado pela contagem do

número de ESTs de micélio e levedura, que o formavam. A razão existente entre o número de ESTs de micélio/número de ESTs de levedura foi utilizada para indicar o nível de expressão gênica diferencial de cada PbAESTs. Assim, foram considerados genes de expressão diferencial, os *contigs* contendo 4 ou mais ESTs em micélio ou em levedura. O método estatístico de Audic & Claverie do programa IDEG6 confirmou o perfil diferencial de 417 genes, com confiabilidade de 95%. Dentre estes 417, 178 eram de micélio e 239 de levedura. Este método mostrou-se bastante preciso, pois 22 genes selecionados tiveram seu perfil diferencial validados por *northern blot*. Destes 417 genes, 264 (63,3%) foram incluídos nos experimentos de microarranjos de cDNA. A escolha destes genes baseou-se nos critérios discutidos em seguida.

Genes diferencialmente expressos por microarranjos de cDNA

Com o aporte dos dados de análise de similaridade de seqüências do transcriptoma, bem como com a disponibilidade dos clones de cDNA dos bancos de micélio e levedura, foi possível escolher seqüências que poderiam compor um “mini-chip” de genes de *P. brasiliensis*, para ser utilizado nos experimentos de microarranjos de cDNA. Este “mini-chip”, além de dar suporte para a realização deste trabalho, já está sendo usado para avaliar a expressão gênica diferencial de *P. brasiliensis* dentro do macrófago e poderá ser usado para muitos outros trabalhos em diferentes condições experimentais.

Para a composição dos microarranjos de cDNA, 1.152 clones foram selecionados a partir de: i) 565 *contigs* formados por 6 ou mais ESTs de micélio e levedura; ii) 39 *contigs* formados por 2, 3, 4 e 5 ESTs, mas exclusivos de micélio ou levedura; iii) 548 *singlets* que apresentavam similaridade com genes de outros organismos depositados em bancos de dados, ou seja que tinham uma anotação funcional. O número total de *singlets* foi determinado pelo limite do número de clones que poderiam ser adicionados no microarranjo de cDNA, construído pelo nosso grupo (1.152 clones).

A primeira etapa para a construção dos microarranjos de cDNA consistiu na seleção e amplificação por PCR destas 1.152 seqüências. Para obtenção de 0,5 - 1µg/µl do produto da PCR necessária para o preparo destes microarranjos de cDNA, foram montados 6 sistemas de amplificação para cada gene e seus produtos reunidos, precipitados, purificados e analisados em gel de agarose. A figura 4 mostra um exemplo

dos produtos amplificados de alguns destes 1.152 genes. Pode-se observar uma amplificação homogênea das bandas correspondentes ao cDNAs clonados, com tamanho que variaram de 0.2 a 2.5 kb.

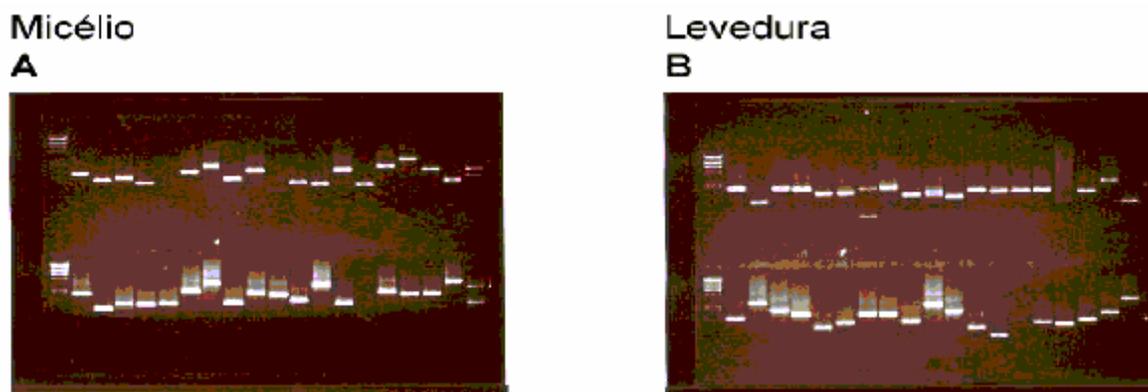


Figura 4. Análise em gel de agarose 0,8% dos produtos da reação de PCR, amplificados a partir dos clones escolhidos nos bancos de cDNA, de micélio e levedura, utilizando os oligonucleotídeos T3 e T7. O marcador de massa molecular utilizado foi o λ Hind III (GibcoBRL). (A) ESTs de micélio e (B) ESTs de levedura.

Durante as amplificações por PCR, parte das amostras apresentaram um menor rendimento nas amplificações dos produtos de PCR. Com o objetivo de corrigir a intensidade do sinal obtido em função da diferença de concentração entre os clones, os mesmos foram divididos em fortes e fracos e aplicados em membranas de *nylon*, separadamente. Os clones fortes foram depositados na membrana 3 vezes pelo robô e, os clones fracos depositados 9 vezes com o objetivo de corrigir a variação de concentração dos produtos de PCR, conforme detalhado na metodologia (item 4.13.2). Para cada tipo celular (micélio ou levedura) foram geradas duas membranas contendo cada uma 576 clones, aplicados em duplicata, totalizando os 1.152 clones. Este procedimento foi realizado em triplicata, gerando 6 membranas para cada tipo celular. Estas membranas foram hibridadas com o oligonucleotídeo-vetor T3 (oligo-vetor) marcado com ^{33}P . Como pode ser visto na figura 5, o resultado mostrou uma viabilidade satisfatória, uma vez que os pontos foram claramente definidos e apresentaram intensidade do sinal adequada para a realização dos ensaios de hibridação com as sondas complexas (cDNA total de micélio ou de levedura, marcados com ^{33}P).

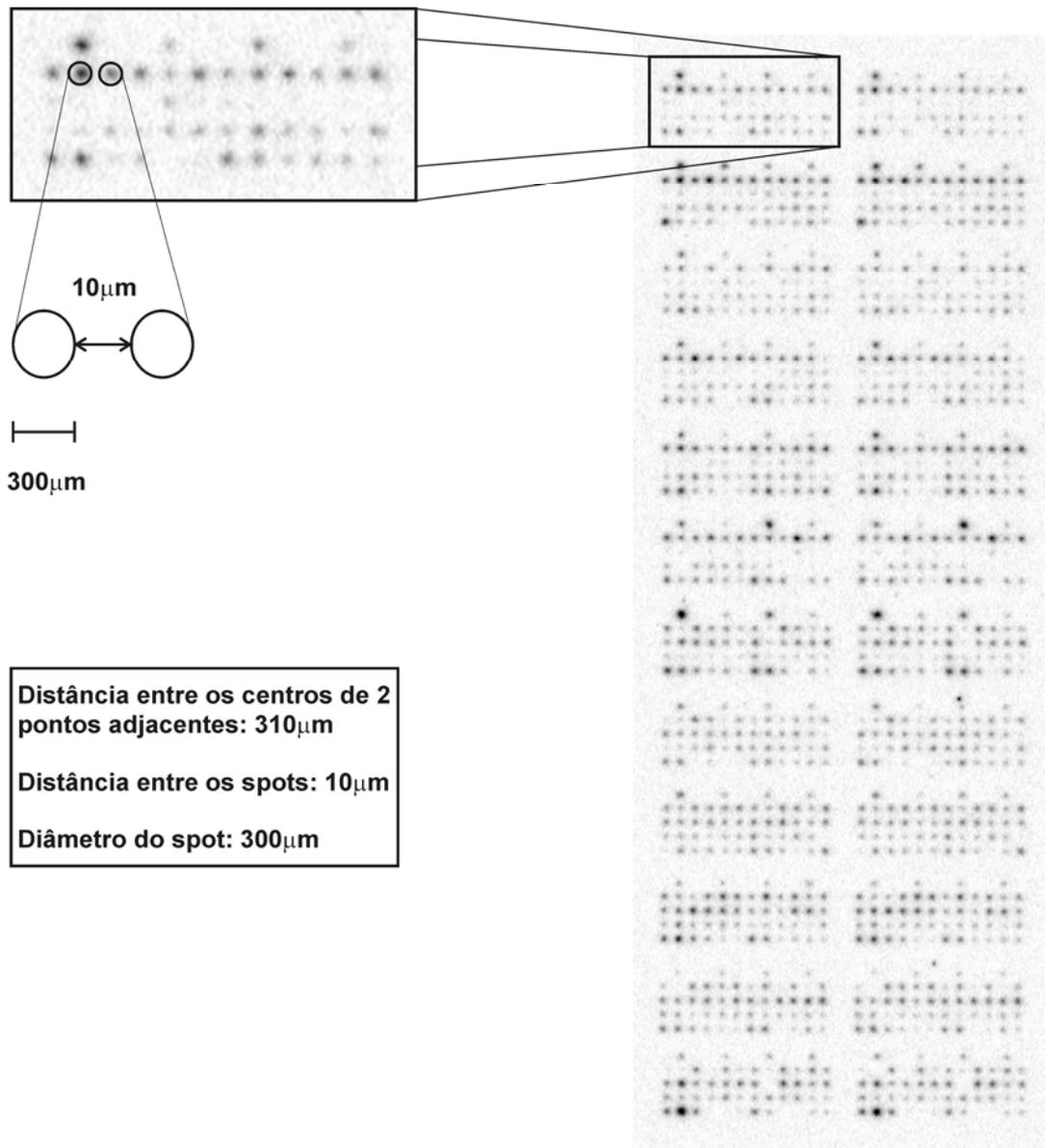


Figura 5. Membrana hibridada com oligo-vetor T3. À direita, a imagem da membrana de nylon com os clones aplicados em duplicata pelo robô (*Array Spotter Generation III*). Destaque, à esquerda, para as distâncias entre os clones.

Após este procedimento as membranas foram hibridadas, com o cDNA total obtido a partir do RNA total de micélio e de levedura (sonda complexa), marcado com ^{33}P . Os RNAs totais foram extraídos de 3 culturas independentes de micélio ou de levedura, com o objetivo de obter uma maior significância dos dados. Este procedimento resultou em 12 imagens (6 membranas de micélio e 6 de levedura - Fig.6). Como pode ser observado, as membranas, independentemente de conterem

clones fortes ou fracos, apresentaram sinais semelhantes de hibridação em função da correção da quantidade do material depositado pelo robô.

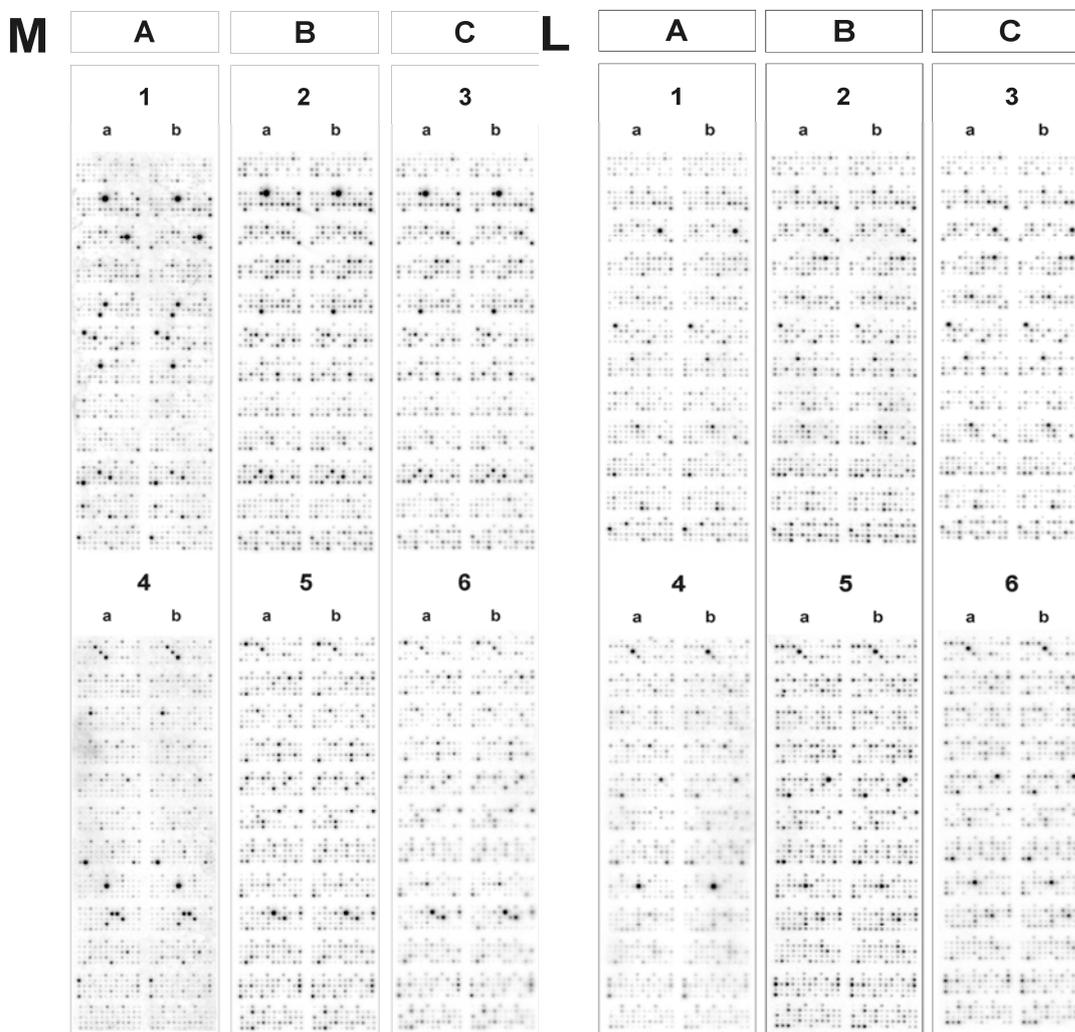


Figura 6. Membranas contendo 1.152 clones hibridadas com as sondas complexas.

M - Membranas geradas para micélio. **L** - Membranas geradas para levedura. Parte esquerda da figura mostra o resultado da hibridação obtida para os 576 clones em cada membrana (1-3) hibridadas com 3 sondas de micélio marcadas independentes (A,B,C) e a parte direita da figura mostrando os demais 576 clones em cada membrana (4-6) hibridadas com 3 sondas de levedura marcadas independentes (A,B,C). Em cada membrana os clones foram depositados em duplicata pelo robô (a/b).

Os sinais resultantes da hidridação foram quantificados, normalizados e submetidos à análise pelo programa SAM (*Significance Analysis of Microarrays*), que

calculou a relevância estatística dos genes diferencialmente expressos identificados em micélio e levedura (Fig. 7). Para a determinação de genes com mudanças significativas na expressão, este programa utiliza o limite Δ (distância entre as linhas oblíquas tracejadas adjacentes e paralelas e a linha oblíqua contínua), sendo considerados diferencialmente expressos os genes que ultrapassam este limite. Com base neste parâmetro, dos 1.152 clones submetidos ao microarranjo de cDNA, 328 (58 de micélio e 270 de levedura) foram considerados diferencialmente expressos, sendo o restante, 824 genes não diferenciais pela análise empregada por este programa.

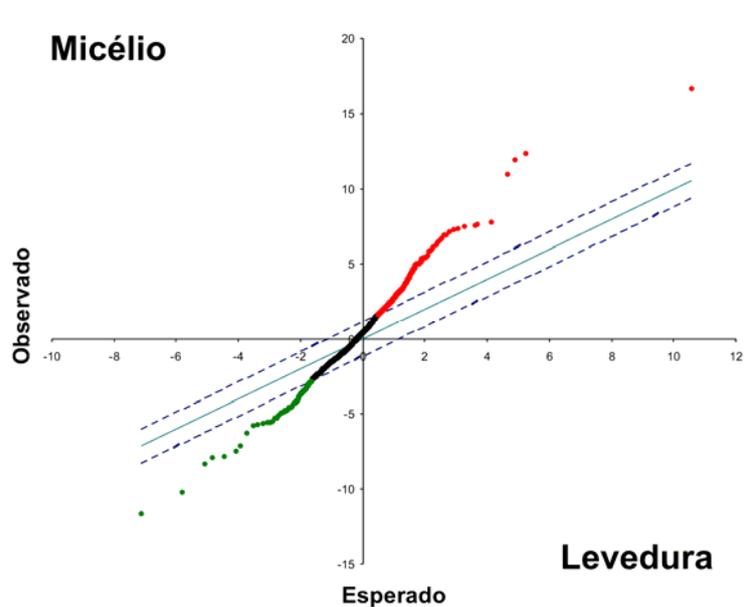


Figura 7. Gráfico representando os genes diferencialmente expressos gerado pelo programa SAM. Os pontos no quadrante superior à direita representam os genes induzidos na forma de levedura (vermelho). Os pontos no quadrante inferior à esquerda representam os genes reprimidos em levedura, isto é, induzidos na forma de micélio (verde). Os parâmetros utilizados foram FDR 4,8% e valor de $Q < 5\%$, o que significa uma confiabilidade maior que 95%.

Tanto a subtração *in silico* como o microarranjo de cDNA identificaram e confirmaram alguns genes de *P. brasiliensis* já descritos na literatura como diferencialmente expressos, muitos deles relatados pelo nosso grupo. Pode-se citar como exemplo: o gene da hidrofobina *Pbhyd1* e *Pbhyd2* (Abuquerque *et al.*, 2004), o gene *M51* (Venâncio *et al.*, 2002) super expressos em células de micélio e o gene *Pby20* (Daher *et al.*, 2005) super expresso nas células de levedura. Estes dados mostram a

consistência de nossos resultados, durante anos de trabalhos com pesquisadores diferentes, utilizando metodologias diferentes, o que está sendo confirmado pela análise diferencial dos genes identificados no transcriptoma do *P. brasiliensis*.

A análise do perfil diferencial de expressão gênica entre micélio e levedura, mostrou o total de 110 genes, diferencialmente expressos, utilizando as duas estratégias subtração *in silico* e microarranjo de cDNA. Estes 110 genes foram classificados em 12 categorias funcionais de acordo com o MIPS, entre as quais: metabolismo de carboidratos (9%); de aminoácidos (9%); controle e organização da parede celular (8%); produção de energia (8%); transcrição, tradução e estruturas ribossomais (8%); metabolismo e transporte de íons (7%), conforme mostrado na figura 8. Os 110 genes diferencialmente expressos estão relacionados nas tabelas 1 e 2, assim como suas respectivas categorias funcionais.

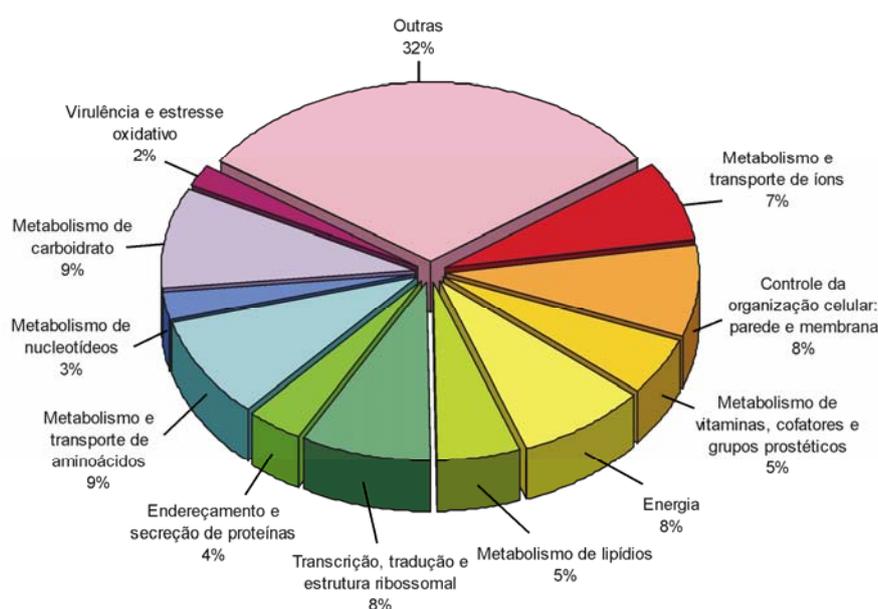


Figura 08. Classificação funcional dos 110 genes diferencialmente expressos de acordo com o MIPS.

A tabela 1 mostra os 31 genes diferencialmente expressos identificados em micélio, sendo que 16 deles foram classificados em 6 categorias funcionais de acordo com MIPS: controle e organização celular, transporte de íons, transcrição, metabolismo de carboidratos, nucleotídeos e lipídeos. Os 15 genes restantes não foram classificados em nenhuma categoria descrita pelo MIPS. O maior *fold change* fornecido pela análise do microarranjo de cDNA foi de 41.666 vezes, correspondente as 653 ESTs

seqüenciadas para o gene *M51*, e o menor foi de 1.4 relativo a um gene que codifica para uma proteína peroxissomal (PEX 16). A tabela 2 mostra os 79 genes diferencialmente expressos em levedura, divididos em 12 categorias funcionais: controle e organização celular; transporte de íons; energia; transcrição, tradução e estrutura ribossomal; metabolismo de carboidratos; aminoácidos; nucleotídeos; lipídeos; vitaminas, co-fatores e grupos prostéticos; endereçamento e secreção de proteínas; virulência e estresse oxidativo nas quais 69 genes encontram-se incluídos, pois foi possível atribuir uma função para todos eles. O maior *fold change* observado foi de 55.6 vezes para um gene que codifica uma proteína de secreção Nce 1, seguido de uma aldolase (37.9). Dois genes ortólogos a transporte e receptor de esteróides (um transportador de esteróide e uma proteína de ligação a estradiol) também mostraram um elevado índice de expressão de 29.3 e 29.5 vezes, respectivamente. O menor *fold change* observado foi de 1.3 vezes para os genes que codificam para uma proteína de membrana mitocondrial homóloga a *N. crassa*, uma profilina e uma proteína ribossomal 60S (L7/L12).

Tabela 1 – Genes diferencialmente expressos em micélio, identificados por subtração *in silico* e microarranjo de cDNA.

PbAEST	Anotação funcional	Número de ESTs		P-value ^a	Fold change ^b	Número de acesso / melhor escore em banco de dados / e-value	Categorias funcionais
		M	L				
202	1,3-beta-glucosidase*	7	2	0.036942	12.3	AAL09828.1 / <i>C. immitis</i> / 1.0e-132	Controle da organização celular: parede e membrana
2155	Peroxisomal membrane protein PEX16 (peroxin-16)	7	0	0.004174	1.4	EAL88469.1 / <i>A. fumigatus</i> / 3.0e-64	
186	HEX*	13	8	0.049272	3.4	EAL91716.1 / <i>A. fumigatus</i> / 3.0e-66	
2496	Iron-sulphur cluster nifU-like protein*	5	1	0.048854	1.7	EAL90111.1 / <i>A. fumigatus</i> / 8.0e-58	Transporte de íons
4179	Potassium transporter protein*	0	1	-	5.2	CAA08814.1 / <i>N. crassa</i> / 4.0e-22	

* Genes diferencialmente expressos confirmados por *northern blot*.

^a Dados gerados pela subtração *in silico*.

^b Dados gerados pelo microarranjo de cDNA. Parâmetros: FDR = 4,8% e Q-value < 5%.

Continuação Tabela 1

PbAEST	Anotação funcional	Número de ESTs		P-value ^a	Fold change ^b	Número de acesso / melhor escore em banco de dados / e-value	Categorias funcionais
1420	U1 small nuclear ribonucleoprotein	9	1	0.00526	1.6	EAL91268.1 / <i>A. fumigatus</i> / 1.0e-60	Transcrição
5530	Beta-succinyl CoA synthetase*	1	0	0.248690	2.7	T49777 / <i>N. crassa</i> / 9e-73	
4749	Glucokinase	1	0	0.248690	1.7	Q92407 / <i>A. niger</i> / 2e-50	Metabolismo de carboidrato
4135	Isocitrate dehydrogenase*	1	0	0.248690	3.1	O13302 / <i>A. capsulatum</i> / 6e-31	
2356	Transaldolase*	4	0	0.030842	-	NP_013458.1 / <i>S. cerevisiae</i> / e-108	
2274	Lactoylglutathione lyase	75	0	0.000000	7.0	NP_105614.1 / <i>M. loti</i> / 1e-11	
4246	Uridine-kinase*	1	0	0.248690	2.7	T41020 / <i>S. pombe</i> / 3e-28	Metabolismo de nucleotídeo
2269	Adenylate kinase*	5	1	0.046263	-	NP_011097.1 / <i>S. cerevisiae</i> / 1e-42	
1318	Amino acid permease	8	0	0.001907	50.4	CAD21063.1 / <i>N. crassa</i> / 0.0	Metabolismo de aminoácidos
1092	Cystathionine beta-synthase	4	0	0.030842	-	AAL09565.1 / <i>P. pastoris</i> / 4e-96	
2476	Palmitoyl-protein thioesterase	4	0	0.030842	-	I58097 / <i>H. sapiens</i> / 8e-42	Metabolismo de lipídios
1029	Methyltransferase	32	1	0.000000	2.1	EAL84975.1 / <i>A. fumigatus</i> / 1.0e-56	
1068	M51*	653	4	0.000000	41666.0	BE758605 / <i>P. brasiliensis</i> / 0.0	
2521	Hydrophobin 1*	56	0	0.000000	-	AAM88289.1 / <i>P. brasiliensis</i> / 2e-51	
2478	Hydrophobin 2*	9	0	0.000951	-	AAR11449.1 / <i>P. brasiliensis</i> / 2e-70	
1789	HSP90 co-chaperone *	19	10	0.018169	-	CAD21185.1 / <i>N. crassa</i> / 4e-48	
1287	2-nitropropane dioxygenase	8	1	0.008606	-	CAB91335.2 / <i>N. crassa</i> / e-133	Outras
2364	Unknown	5	1	0.046263	3.6	-	
379	Unknown	5	1	0.046263	4.9	-	
2458	Unknown	13	6	0.025336	-	-	
1470	Unknown	8	2	0.021572	20.1	-	
2096	Unkown	20	1	0.000006	5.6	-	
514	Unkown	15	1	0.000138	23.4	-	
1045	Unkown	13	2	0.001769	24	-	
1178	Unkown	10	0	0.000535	8.5	-	
1664	Unkown	10	3	0.018648	2.5	-	

* Genes diferencialmente expressos confirmados por *northern blot*.

^a Dados gerados pela subtração *in silico*.

^b Dados gerados pelo microarranjo de cDNA .Parâmetros:FDR = 4,8% e Q-value < 5%.

Tabela 2 – Genes diferencialmente expressos em levedura, identificados por subtração *in silico* e microarranjo de cDNA.

PbAEST	Anotação funcional	Número de ESTs		P-value ^a	Fold change ^b	Número de acesso / melhor escore em banco de dados / e-value	Categorias funcionais
		M	L				
1422	Alpha-1,2-mannosyltransferase (Alg11)	4	11	0.019803	2.0	EAL88400.1 / <i>A. fumigatus</i> / 1.0e-130	
4988	Alpha 1,3-glucan synthase*	0	1	-	5.7	AAV52833.1 / <i>P. brasiliensis</i> / 4.0e-93	
737	Xylanase/chitin deacetylase*	8	33	0.000023	2.8	NP_223015.1 / <i>H. pylori</i> / e-113	
201	Putative membrane protein Nce2	0	27	0.000000	25.2	NP_015475.1 / <i>S. cerevisiae</i> / 5e-08	Controle da organização celular: parede e membrana
2162	Putative WW domain protein (probable membrane protein)	4	12	0.013092	3.6	EAL85876.1 / <i>A. fumigatus</i> / 6.0e-17	
136	Involved in cytoskeletal organization and cellular growth (verprolin)*	4	10	0.029289	4.0	NP_013441.1 / <i>S. cerevisiae</i> / 2.3	
667	Adenylylsulphate kinase	3	8	0.038949	2.1	EAL90409.1 / <i>A. fumigatus</i> / 1.0e-88	
48	ATP-sulphurylase*	10	18	0.023038	4.8	EAL92915.1 / <i>A. fumigatus</i> / 0.0	
2724	P-type Cu(2+) transporting ATPase*	0	1	-	3.8	NP_009854.1 / <i>S. cerevisiae</i> / 1.7e-20	Metabolismo e transporte de íons
797	Choline sulfatase*	3	15	0.001602	4.8	NP_248721.1 / <i>P. aeruginosa</i> / e-104	
1585	PAPS reductase*	1	12	0.000815	5.1	AAG24520.1 / <i>P. chrysogenum</i> / e-121	
2031	Outer mitochondrial membrane protein porin	1	14	0.000207	1.3	XP_323644.1 / <i>N. crassa</i> / 1.0e-108	
635	ATP citrate lyase	1	7	0.014984	1.9	EAL88915.1 / <i>A. fumigatus</i> / 0.0	
2016	ATPase inhibitor; Inh1	2	14	0.000835	2.7	NP_010100.1 / <i>S. cerevisiae</i> / 4.0e-08	
563	Cytochrome c oxidase subunit VII	11	43	0.000002	2.1	AAT77147.1 / <i>P. brasiliensis</i> / 3.0e-26	
2398	Disulfide isomerase	3	8	0.038949	2.1	EAL91387.1 / <i>A. fumigatus</i> / 3.0e-61	Energia
540	Cytochrome C oxidase biogenesis protein	0	5	0.015111	1.8	XP_214182.2 / <i>R. norvegicus</i> / 1.0e-06	
578	Pyruvate dehydrogenase e1 component beta subunit	2	7	0.033994	1.6	EAL86696.1 / <i>A. fumigatus</i> / 2.0e-99	
701	Pyruvate dehydrogenase*	1	9	0.004973	-	Q10489 / <i>S. pombe</i> / 1e-72	

Continuação Tabela 2

PbAEST	Anotação funcional	Número de ESTs		P-value ^a	Fold change ^b	Número de acesso / melhor escore em banco de dados / e-value	Categorias funcionais
407	Succinyl-CoA synthetase alpha subunit	7	19	0.004468	2.6	EAL91981.1 / <i>A. fumigatus</i> / 1.0e-155	
284	Ubiquinol-cytochrome C reductase complex ubiquinone-binding protein QP-C	0	4	0.030475	1.5	EAL90680.1 / <i>A. fumigatus</i> / 7.0e-29	
378	Argininosuccinate synthase	0	6	0.007492	1.7	NP_229577.1 / <i>T. maritime</i> / 4.0e-77	
171	Branched-chain aminotransferase	0	5	0.015790	-	NP_012078.1 / <i>S. cerevisiae</i> / 7e-87	
314	Aspartate aminotransferase	0	4	0.031496	-	NP_509047.1 / <i>C. elegans</i> / 4e-96	
963	Histidinol-phosphate aminotransferase*	0	4	0.031496	-	P36605 / <i>S. pombe</i> / 4e-87	
980	Acetamidase*	0	4	0.031496	-	AAK31195.1 / <i>A. terreus</i> / 2e-09	Metabolismo de aminoácidos
3073	Phenylacetate hydroxylase	0	1	0.249998	2.3	AAF21760.1 / <i>P. chrysogenum</i> / 2e-48	
1618	Aromatic-L-amino-acid decarboxylase	1	33	0.00000	17.2	EAL86509.1 / <i>A. fumigatus</i> / 0.0	
125	Glycine cleavage system h protein	4	9	0.042192	1.4	EAL90537.1 / <i>A. fumigatus</i> / 6.0e-36	
1674	Aldolase	5	14	0.010368	37.9	AAL34519.2 / <i>P. brasiliensis</i> / 0.0	
2431	Alcohol dehydrogenase I*	2	45	0.000000	-	P41747 / <i>A. flavus</i> / e-129	
865	Isocitrate lyase*	0	4	0.031496	-	AAK72548.2 / <i>C. immitis</i> / e-119	Metabolismo de carboidrato
814	Glyoxylate pathway regulator ^c	0	15	0.000016	17.7	NP_009936.1 / <i>S. cerevisiae</i> / 4e-37	
42	Phosphoglycerate kinase	1	10	0.002512	2.6	EAL90363.1 / <i>A. fumigatus</i> / 0.0	
9	Beta-ketoacyl synthase (Cem1)	1	5	0.045709	2.2	EAL87667.1 / <i>A. fumigatus</i> / 1.0e-88	
780	GPR/FUN34 family protein	0	11	0.000225	14.9	EAL87502.1 / <i>A. fumigatus</i> / 6.0e-67	
555	Acyl-CoA synthetase*	0	4	0.031496	-	NP_275799.1 / <i>M. thermautotrophicus</i> / 9e-89	Metabolismo de lipídios
1989	Acetyl-coenzyme A synthetase (Acetate--CoA ligase) (Acyl-activating enzyme)	1	9	0.004605	2.0	EAL89682.1 / <i>A. fumigatus</i> / 0.0	
1550	NADH-cytochrome b5 reductase	0	6	0.007492	5.4	EAL88164.1 / <i>A. fumigatus</i> / 1.0e-86	

Continuação Tabela 2

PbAEST	Anotação funcional	Número de ESTs		P-value ^a	Fold change ^b	Número de acesso / melhor escore em banco de dados / e-value	Categorias funcionais
300	Nucleoside diphosphate kinase	6	58	0.00000	1.6	AAP85295.1 / <i>A. fumigatus</i> / 2.0e-67	Metabolismo de nucleotídeos
547	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	0	6	0.007492	1.4	AAD55372.1 / <i>A. fumigatus</i> / 9.0e-56	
924	Coproporphyrinogen III oxidase	2	7	0.033994	2.7	EAL88456.1 / <i>A. fumigatus</i> / 0.0	
867	NADH pyrophosphatase	1	5	0.045709	5.7	EAL85969.1 / <i>A. fumigatus</i> / 1.0e-159	Metabolismo de vitaminas, cofatores e grupos prostéticos
279	Dihydropteroate synthase	0	4	0.031496	-	T49535 / <i>N. crassa</i> / 1e-38	
1490	Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	0	10	0.000453	3.5	AAC28862.1 / <i>S. commune</i> / 2.0e-32	
447	NADH:ubiquinone oxidoreductase B18 subunit	1	10	0.002512	1.4	EAL92195.1 / <i>A. fumigatus</i> / 9.0e-33	
1704	60S ribosomal protein L19 ^f	0	14	0.000032	-	NP_596715.1 / <i>S. pombe</i> / 6e-49	
488	Exonuclease II	1	5	0.045709	1.9	EAL85993.1 / <i>A. fumigatus</i> / 1.0e-138	
165	RNP domain protein	3	13	0.003962	1.8	EAL89070.1 / <i>A. fumigatus</i> / 5.0e-81	
2436	Splicing factor u2af 35 kd subunit	2	7	0.033994	2.5	EAL86523.1 / <i>A. fumigatus</i> / 1.0e-103	
756	Glutamyl-tRNA amidotransferase	0	4	0.031496	-	Q33446 / <i>E. nidulans</i> / 1e-15	Transcrição, tradução e estrutura ribossomal
253	Zinc finger, C3HC4 type	0	5	0.015111	1.4	NP_593329.1 / <i>S. cerevisiae</i> / 3.0e-10	
551	Ribosomal protein L35**	5	10	0.044755	-	AAL08563.1 / <i>P. brasiliensis</i> / 1.0e-63	
979	60S ribosomal protein L7/L12 precursor	1	8	0.008358	1.3	EAL89813.1 / <i>A. fumigatus</i> / 4.0e-49	
175	Complex I intermediate-associated protein CIA30 precursor	4	15	0.003399	5.6	EAL92946.1 / <i>A. fumigatus</i> / 1.0e-114	
832	Glutathione S transferase	1	7	0.014984	2.0	NP_588171.1 / <i>S. pombe</i> / 7.0e-42	
2387	Non-classical export protein (Nce1)	1	7	0.014984	55.6	EAL87256.1 / <i>A. fumigatus</i> / 1.0e-29	Endereçamento e secreção de proteínas
1823	Profilin	1	5	0.045709	1.3	NP_014765.1 / <i>S. cerevisiae</i> / 8.0e-14	
2509	Cu-Zn Superoxide dismutase	5	14	0.010801	-	Q9Y8D9 / <i>A. fumigatus</i> / 1e-68	Virulência e estresse oxidativo
50	Cu-Zn superoxide dismutase-related*	0	8	0.001842	2.1	CAB97297.1 / <i>N. crassa</i> / 3.0e-30	

Continuação Tabela 2

PbAEST	Anotação funcional	Número de ESTs		P-value ^a	Fold change ^b	Número de acesso / melhor escore em banco de dados / e-value	Categorias funcionais
4188	Mating type protein (MAT1-2)*	1	0	-	8.0	EAL89707.1 / <i>A. fumigatus</i> / 2.0e-36	
2059	Ribosome associated protein (Stm1)	6	31	0.000007	1.7	EAL92489.1 / <i>A. fumigatus</i> / 2.0e-32	
258	Isochorismatase	0	4	0.031496	-	NP_436193.1 / <i>S. meliloti</i> / 1e-20	
244	Gluconate dehydrogenase	0	4	0.031496	-	NP_471610.1 / <i>L. innocua</i> / 1e-09	
2005	Signal peptide protein	1	6	0.026442	2.3	EAL93249.1 / <i>A. fumigatus</i> / 7.0e-68	
2536	Y20 protein*	27	88	0.000000	8.7	AAL50803.1 / <i>P. brasiliensis</i> / e-106	
63	Putative methyltransferase	3	11	0.011314	2.5	CAD21381.1 / <i>N. crassa</i> / 2e-46	
778	Putative estradiol binding protein*	3	11	0.011314	29.5	NP_012049.1 / <i>S. cerevisiae</i> / 1e-31	
1724	Putative sterol transporter*	0	6	0.007915	29.3	NP_013748.1 / <i>S. cerevisiae</i> / 4e-12	
767	Unknown	3	10	0.017732	2.2	-	Outras
39	Unknown	0	6	0.007492	2.2	-	
33	Unknown	0	8	0.001842	3.1	-	
1442	Unknown	3	16	0.000836	4.5	-	
2399	Unknown	1	5	0.045709	2.5	-	
512	Unknown	0	6	0.007492	4.3	-	
639	Unknown	0	7	0.003715	1.7	-	
718	Unknown	0	6	0.007492	1.8	-	
765	Unknown	0	10	0.000453	3.9	-	
529	Unknown	1	5	0.045709	18.8	-	

- Genes diferencialmente expressos confirmados por *northern blot*.

^a Dados gerados pela subtração *in silico*.

^b Dados gerados pelo microarranjo de cDNA .Parâmetros:FDR = 4,8% e Q-value < 5%.

•

Após a classificação funcional, genes envolvidos em 4 processos celulares (metabolismo - ciclo do glioxilato, transporte de íons, metabolismo de enxofre e organização celular) foram selecionados para confirmar seu caráter diferencial por *northern blot*. Destes genes, 12 foram identificados como envolvidos no metabolismo de carboidratos, de lipídeos, enxofre, aminoácidos e acetamida que geram Acetil-CoA (*icdh*-isocitrato desidrogenase, *scs*- β -sucinil CoA sintetase, *tal*- transaldolase, *adk*- adenilato quinase, *udk*- uridina quinase, *icl*- isocitrato liase, *acylcs*- Acil-CoA sintetase, *pdh*- piruvato desidrogenase, *adh*- álcool desidrogenase, *papsr*- PAPS redutase, *aca*- acetamidase, *amt*- aminotransferase; 2 genes relacionados ao metabolismo de enxofre (*chs*- colina sulfatase e *ats*- ATP-sulfurilase); 3 genes relacionados ao transporte de íons (*isc*- iron-sulfur cluster, *ktp*- cation transporter de cation, *pct*- Provável P-type cátion) e 5 envolvidos na organização celular (*hex*-proteína peroxissomal hexagonal, *bgl*- 1,3 β -glucosidase, *ags*- α 1,3- glucana sintase, *cda*- quitina deacetilase e *vrp*-verprolin). Estas categorias foram escolhidas pela presença de genes essenciais para o entendimento do processo de dimorfismo celular em *P. brasiliensis*. Além disso, uma análise aprofundada de genes envolvidos nestes processos geram informações sobre o perfil diferencial deste patógeno, importante para um melhor entendimento do seu ciclo de vida e da sua patogênese, sendo de fundamental importância para o desenvolvimento de drogas específicas para o tratamento de infecções fúngicas.

5.2.1 - Genes de expressão diferencial de *P. brasiliensis* envolvidos no metabolismo de carboidratos e vias metabólicas que geram acetil-CoA (lipídeos, aminoácidos, acetamida e enxofre)

Durante a anotação do transcriptoma de *P. brasiliensis*, comparando-se todos os genes identificados com os de *S. cerevisiae* e outros fungos, observou-se que 29% estavam relacionados ao metabolismo geral (Anexo 1 – tabela 4 suplementar). Destes genes, 70% estavam envolvidos em processos essenciais para a sobrevivência do fungo, tais como: metabolismo de carboidratos, lipídios, purinas e pirimidinas, aminoácidos, ciclo da uréia, vias acessórias envolvendo enxofre e vitaminas e co-fatores (Fig. 9).

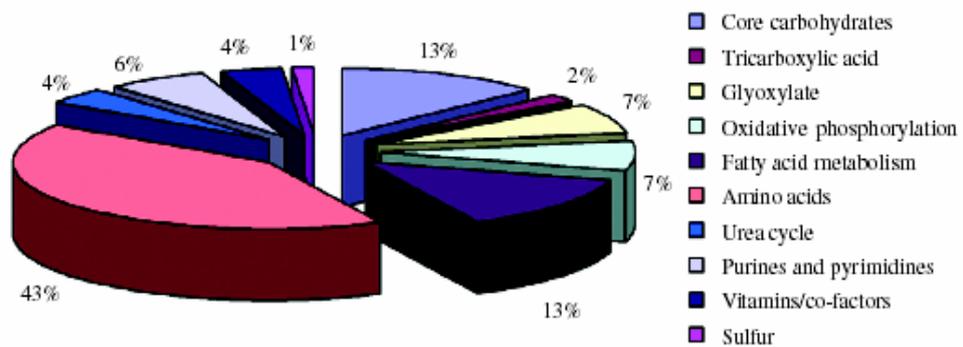


Figura 9. Distribuição dos genes identificados no transcriptoma de *P. brasiliensis* nas principais vias metabólicas (Arraes *et al.*, 2005).

Foram identificados genes que codificam para enzimas constituintes das vias clássicas do metabolismo de açúcar como via glicolítica, fermentação alcoólica, ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs) e ciclo do glioxilato (Fig. 9). Dentre as vias metabólicas relacionadas com a virulência de organismos patogênicos destaca-se o ciclo do glioxilato, o qual já foi relatado em bactérias, plantas e fungos, e permite a utilização de compostos de dois carbonos como fonte para a síntese de glicose (Lorenz & Fink, 2001). Este ciclo representa uma via alternativa à do ciclo do citrato para a oxidação do acetato (acetil CoA) em ácidos dicarboxílicos (succinato, malato e oxaloacetato), em vez disto, isocitrato é clivado em succinato e glioxilato, pela enzima isocitrato liase. Subseqüentemente, o glioxilato é convertido em malato pela ação da enzima malato sintase.

No transcriptoma de *P. brasiliensis* foram identificados genes ortólogos aos genes isocitrato liase (*icl1*) e malato sintase (*mls1*) de *C. albicans*. Análises por *northern blot* mostraram um aumento significativo na expressão do gene *icl1* em células leveduriformes de *P. brasiliensis* quando comparada à expressão do referido gene pela forma miceliana desse organismo (Fig. 10). A super expressão dos genes que codificam para *icl1* e *mls1* nesta situação permite a produção de glicose “*de novo*” a partir de dois carbonos (C2), como acetato, produto da degradação de ácidos graxos. Provavelmente em *P. brasiliensis* estes genes se comportem como fatores de virulência, de acordo com o que foi proposto para *C. albicans*, já que este fungo é um patógeno intracelular facultativo e necessita de mecanismos que permitam sua sobrevivência do interior de

células fagocitárias, um ambiente pobre em carboidratos (Finlay & Falkow, 1997; Lorenz & FinK, 2001).

Adicionalmente a estes resultados, obtidos *in silico* e, buscando um melhor entendimento das interações hospedeiro-patógeno, nosso grupo vem estudando a expressão de genes deste patógeno em modelo experimental de infecção de macrófago de camundongos. Recentemente, resultados obtidos por Derengowski (2006) mostraram um significativo aumento nos níveis de expressão dos genes *icl1* e *mls1* de *P. brasiliensis*, quando do cultivo do fungo na ausência de glicose e em presença de acetato, visando simular um possível estresse nutricional como o que provavelmente ocorre no interior de células fagocitárias. Além disso, experimentos de RT-PCR semiquantitativa, utilizando RNA do fungo obtido a partir da infecção de macrófagos peritoniais de camundongos com leveduras de *P. brasiliensis*, demonstraram que os níveis de expressão dos genes *icl1* e *mls1* de *P. brasiliensis* apresentaram um aumento, comparando-se aos níveis de expressão dos mesmos genes quando do cultivo padrão das leveduras em meio acelular. Esses resultados indicam um possível mecanismo de adaptação do fungo ao ambiente hostil encontrado no interior de macrófagos.

O etanol também pode ser usado como carbono e fonte de energia por muitos fungos, e todas as enzimas necessárias para produzi-lo também foram encontradas em *P. brasiliensis*. A assimilação ocorre através de metabólitos intermediários, acetaldeído, acetato e acetil-CoA. As enzimas álcool desidrogenase, que catalisa a redução reversível de acetaldeído para etanol, é fundamental para a produção ou utilização de etanol.

A identificação de genes diferencialmente expressos envolvidos no metabolismo de *P. brasiliensis* pela subtração *in silico* e microarranjo de cDNA permitiu a inferência de um perfil enzimático diferencial para este patógeno. Destes genes identificados, 12 (5 de micélio e 7 de levedura) foram selecionados e seu perfil diferencial de expressão confirmados por *northern blot* (Fig. 10).

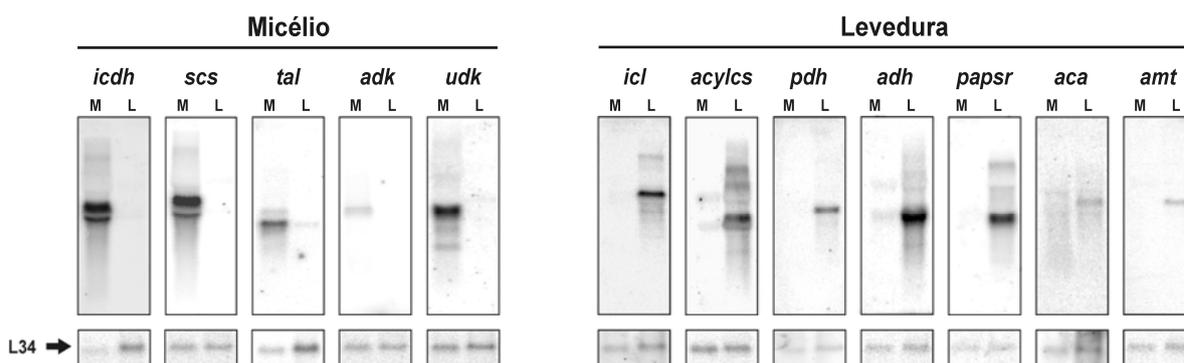


Figura 10. Análise por *northern blot* de genes diferencialmente expressos em micélio e levedura de *P. brasiliensis* envolvidos no metabolismo diferencial de carboidratos. RNA total de micélio (M) e levedura (L) foram analisados em gel desnaturante e transferidos para membranas de *nylon*, as quais foram hibridadas com sondas marcadas radioativamente dos seguintes genes: *icdh*-isocitrato desidrogenase, *scs*- β -succinil CoA sintetase, *tal*- transaldolase, *adk*- adenilato quinase, *udk*- uridina quinase, *icl*- isocitrato liase, *acylcs*- Acil-CoA sintetase, *pdh*- piruvato desidrogenase, *adh*- álcool desidrogenase, *papsr*- PAPS redutase, *aca*- acetamidase, *amt*- aminotransferase. A proteína 60S ribossomal L34 constitutiva foi usada como controle da quantidade de RNA total aplicado em cada amostra.

Os resultados das análises comparativas entre os níveis de expressão dos dois tipos celulares evidenciaram para as células de micélio (saprófitas), um metabolismo preferencialmente aeróbico, em contraste às células leveduriformes. Como pode ser visto na figura 10, os genes que codificam para isocitrato desidrogenase e succinil-CoA, pontos de regulação do ciclo do citrato, encontram-se super expressos em micélio sugerindo um desvio metabólico para a cadeia de transporte de elétrons (CTE) e fosforilação oxidativa. A glicoquinase também é induzida nestas células produzindo glucose-6-fosfato, a qual é provavelmente oxidada na via das pentoses-fosfato gerando ribose-5-fosfato que servirá para síntese de purinas e pirimidinas. Essa característica se correlaciona com a super expressão dos genes de adenilato quinase e uridina quinase. O excesso de ribose-5-fosfato é provavelmente convertido a gliceradeído-3- fosfato pelas reações não oxidativas da via pentose-fosfato caracterizada pela super expressão da transaldolase. Esses açúcares são convertidos a piruvato e acetil-CoA para uso no ciclo do ácido cítrico em condições aeróbicas.

Já as células leveduriformes de *P. brasiliensis* apresentam uma super expressão dos genes que codificam para álcool desidrogenase, piruvato desidrogenase e isocitrato liase (Fig. 10) dirigindo provavelmente o metabolismo de carboidratos para a produção de etanol, refletindo um comportamento anaeróbico para este tipo celular. A figura 11 mostra esquematicamente o padrão diferencial da expressão dos genes envolvidos no metabolismo central de carboidratos, em micélio e levedura de *P. brasiliensis*. Em adição, vias que fornecem acetato para o ciclo do glioxilato aparentemente encontram-se estimuladas pela alta expressão dos genes que codificam para enzimas tais como acetamidase, aminotransferase e PAPS redutase.

Em levedura, a isocitrato liase redireciona o metabolismo utilizando etanol e acetato como fontes de carbono, gerando o oxalacetato que pode ser reconvertido para fosfoenolpiruvato (PEP). O gene da aminotransferase de cadeia ramificada é também super expresso (assim como outros genes de aminotransferase como aspartato e histidinol-P) e permite a conversão de valina, leucina e isoleucina em acetil-CoA, o qual é posteriormente utilizado no ciclo do glioxilato. A acetamidase, que é diferencialmente expressa em células de levedura, também contribui para a via de transformação de acetoamida em acetato. A acil-CoA sintetase, também super expressa em levedura, gera acetil-CoA através da β -oxidação que pode ser aproveitado neste ciclo. Todas as análises sugerem que a produção de ATP através da fermentação alcoólica e da cadeia respiratória ocorre em um padrão diferencial na fase de levedura e em micélio, respectivamente.

O fato de ter sido detectado um desvio do metabolismo aeróbico para anaeróbico, bem como a ativação do ciclo do glioxilato em leveduras cultivadas *in vitro*, pode ser explicado pela possibilidade de ter sido utilizada uma cultura de células de levedura em condições de estresse nutricional, o que estaria de acordo com os dados encontrados por Derengowski (2006).

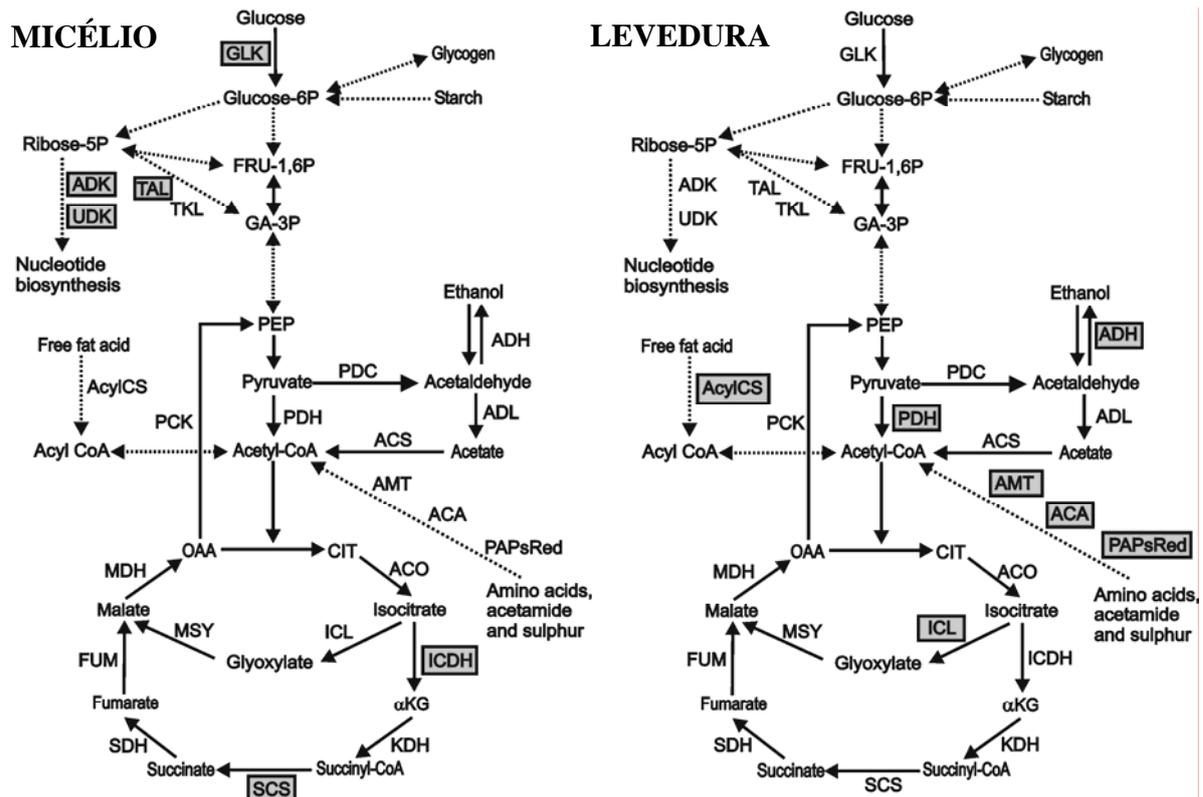


Figura 11. Comparação do padrão de expressão de genes que codificam para as enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos de micélio para levedura em *P. brasiliensis*.

5.2.2 - Genes de expressão diferencial de *P. brasiliensis* envolvidos no metabolismo de enxofre

Os fungos filamentosos e leveduras possuem vias regulatórias complexas que governam a expressão de um conjunto de permeases e enzimas, usadas para assimilar enxofre inorgânico. Estas vias de assimilação do enxofre estão bem definidas em fungos como *Neurospora*, *Aspergillus*, *S. cerevisiae* e plantas (Marzluf, 1997).

O sulfato inorgânico é assimilado pela célula através das permease e é utilizado pela ATP-sulfurilase (ATP sulfato adeniltransferase) resultando na formação de adenosina-5 fosfosulfato (APS). A ATP-sulfurilase, em *Penicillium chrysogenum* e outros fungos filamentosos, sofre inibição alostérica por PAPS (3-fosfoadenosina-5-fosfosulfato) que é o produto do próximo passo desta via metabólica catalisado pela APS quinase. As duas etapas subseqüentes são catalisadas pela PAPS redutase e sulfito redutase que resulta na formação de sulfito (S_2^-) que será utilizado para formar cisteína,

pela ação da cisteína sintase (Marzluf, 1997). A cisteína é um importante precursor de moléculas orgânicas tais como: metionina, proteínas, vitaminas, co-fatores e hormônios essenciais para o crescimento e atividade de todas as células (Fig.12).

PAPS em eucarioto é utilizado para diferentes propósitos como transferência do grupo sulfurila e regulação do metabolismo celular. O acúmulo de PAPS pode ser tóxico para a célula, neste caso, este composto pode ser direcionado para a formação de colina-O-sulfato, reação catalisada pela colina sulfotransferase (PAPS colina sulfotransferase) (Marzluf, 1997). A colina-O-sulfato, é uma excelente fonte de estoque de enxofre podendo ser resgatada quando o enxofre não se encontra disponível, além de funcionar como osmoprotetor (Spencer *et al.*, 1968). A colina sulfatase é outra enzima chave do metabolismo de enxofre (Spencer *et al.*, 1968; Marzluf, 1997) e catalisa a hidrólise da colina-O-sulfato para formar sulfato inorgânico que pode ser reutilizado como substrato para a síntese de cisteína (Fig.12).

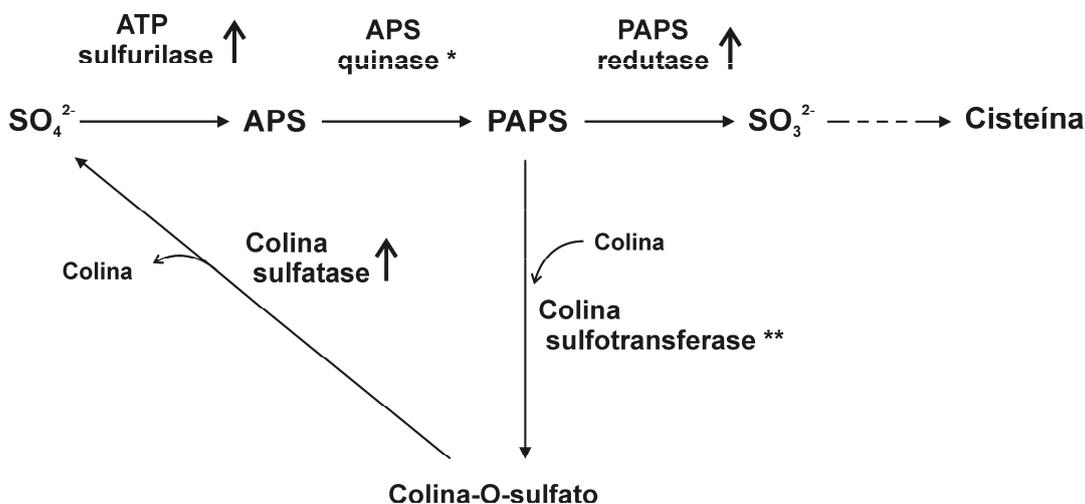


Figura 12. Principais enzimas envolvidas na biossíntese *de novo* de cisteína. As setas indicam as enzimas super reguladas pela subtração eletrônica, microarranjo de cDNA e confirmadas por *northern blot*. (*) Enzima super expressa pela subtração *in silico* e microarranjo de cDNA, ainda não confirmado por *northern blot* (**). Enzima não identificada no transcriptoma de *P. brasiliensis*.

Em *P. brasiliensis*, a análise por subtração *in silico* e microarranjo de cDNA demonstraram um aumento na expressão nas células de levedura dos genes que codificam as enzimas ATP-sulfurilase, APS kinase, PAPS redutase e colina sulfatase. Estas enzimas estão envolvidas na síntese de *ново* de cisteína, revelando a importância do enxofre no crescimento e diferenciação deste patógeno. Experimentos de *northern blot* confirmaram o caráter diferencial dos genes que codificam para as enzimas PAPS redutase (Fig.9) e para colina sulfatase e ATP-sulfurilase (Fig.13c).

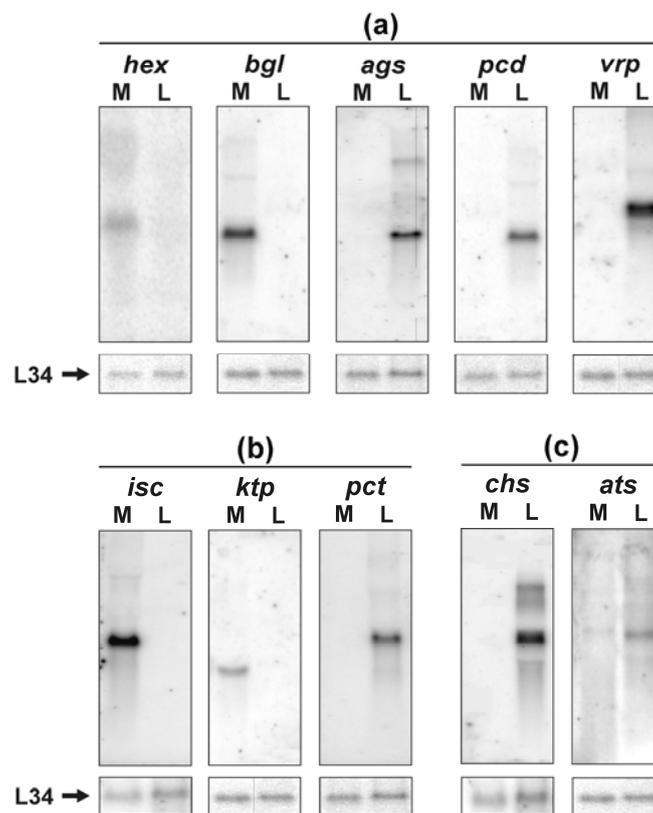


Figura 13. Análise por *northern blot* de genes super expressos em micélio e levedura de *P. brasiliensis*. RNA total de micélio (M) e levedura (L) foram analisados em gel desnaturante e transferidos para membranas de nylon, as quais foram hibridadas com sondas marcadas radioativamente dos seguintes genes específicos: a) Organização celular: *hex*-proteína peroxissomal hexagonal, *bgl*- 1,3 β -glucosidase, *ags*- α -1,3-glucana sintase, *cda*- quitina deacetilase e *vrp*- verprolin. b) Transporte de íons: *isc*- iron-sulfur cluster, *ktp*- cation transporter de cation, *pct*- provável P-type cation. c) Metabolismo de enxofre: *chs*- coline sulfatase e *ats*- ATP sulfurilase. A proteína 60S ribossomal L34 constitutiva foi usada como controle de quantidade de RNA total aplicado em cada amostra.

Paralelamente, considerando que em plantas e em outros fungos uma fração do PAPS é usada para produzir colina-O-sulfato, em *P. brasiliensis* este metabólito poderia estar sendo usado também como um osmoprotetor e como estoque de enxofre citosólico. Não foi encontrado o gene que codifica para a colina sulfotransferase no transcriptoma de *P. brasiliensis*, o que não significa que ela não exista, pois ainda faltam identificar cerca de 20% - 30% dos genes expressos. No entanto, o fato da colina sulfatase apresentar-se super expressa na forma de levedura, sugere que deve existir colina-O-sulfato disponível nestas células, que estaria sendo hidrolisado para liberar sulfato inorgânico para outros propósitos, incluindo a síntese de cisteína. Estes dados sugerem também que, além da temperatura, o enxofre orgânico pode ser um estímulo importante para manter o *P. brasiliensis* na fase de levedura, como no caso do *H. capsulatum* (Hwang *et al.*, 2003).

Foi relatado por Medoff *et al.* (1987) que a cisteína e compostos sulfurilados são necessários para a completa transição celular de micélio para levedura nos fungos *Blastomyces dermatitidis* e *P. brasiliensis*. Com base nisto e considerando a expressão diferencial dos genes, verificada através da subtração *in silico* e microarranjo de cDNA, que codificam para as enzimas colina sulfatase, ATP sulfurilase e PAPS redutase, da principal via de assimilação de enxofre, foi proposto um experimento visando verificar o crescimento e a diferenciação celular de *P. brasiliensis* em meio MVM, sem e com diferentes concentrações de enxofre inorgânico. Com este experimento foi possível mostrar que a variação de enxofre inorgânico no meio não alterou o crescimento e a diferenciação celular de *P. brasiliensis* (Fig.14). Neste contexto, os resultados sugerem que a demanda de cisteína em levedura é maior que em micélio e, tanto a síntese *de novo* de cisteína como a captação externa está aumentada, uma vez que os principais genes que codificam as enzimas responsáveis pela síntese de cisteína encontram-se super expressos em levedura. Corroborando com estes resultados, Medoff *et al.* (1987) sugerem que a forma de levedura, por ser auxotrófica para enxofre orgânico, provavelmente necessita de uma produção elevada de cisteína e para isto utiliza também a via de assimilação de enxofre inorgânico, mais do que as células de micélio de *P. brasiliensis*.

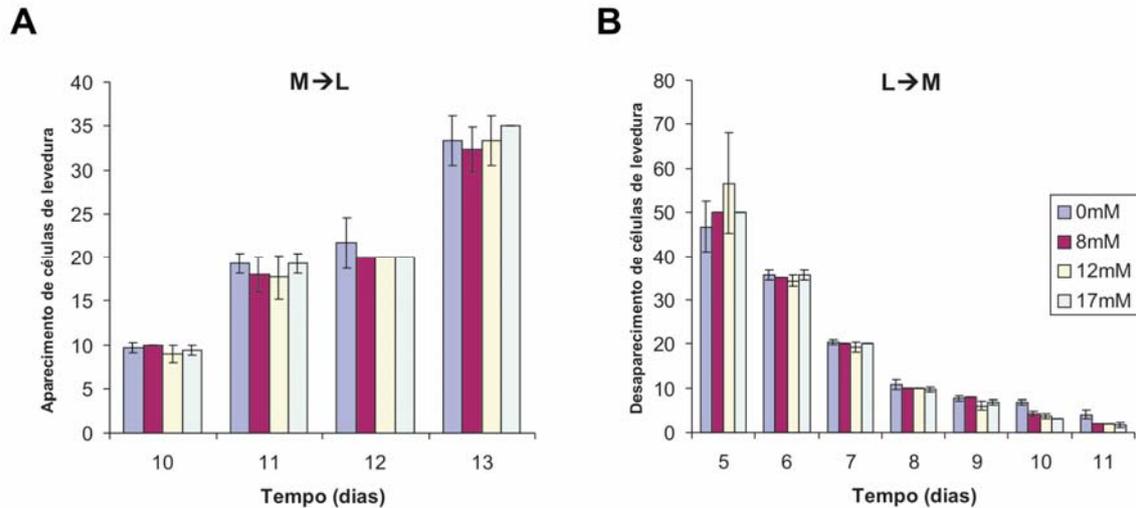


Figura 14. Diferenciação celular de *P. brasiliensis* em meio MVM em diferentes níveis de enxofre inorgânico. A- Aparecimento de células de levedura a partir do décimo dia de diferenciação de micélio para levedura. B- Desaparecimento de células de levedura a partir do quinto dia de diferenciação de levedura para micélio. As concentrações de sulfato de amônio utilizadas foram (0mM, 8mM, 12mM e 17mM). No gráfico estão mostrados os valores das médias das triplicatas (caixas coloridas) e os desvios-padrões correspondentes (barras).

5.2.3 - Genes de expressão diferencial de *P. brasiliensis* envolvidos no transporte de íons

Os 3 genes envolvidos no transporte de íons mostraram-se diferencialmente expressos pela subtração *in silico* e microarranjo de cDNA, bem como tiveram seu caráter diferencial confirmado por *northern blot* (Fig.13b). Os genes *isc* (iron-sulfur cluster) e *ktp* (transportador de cátions) são super expressos em micélio e *pct* (putative p-type cátion) altamente expresso em levedura.

O gene *ktp* codifica para uma proteína que apresenta elevada homologia com proteínas transportadoras de potássio, da família HAK, em *N. crassa* que está relacionada a condições de deficiência de potássio. Considerando que o nicho ecológico destes fungos é o solo, onde enfrentam ambientes diluídos e variáveis, sendo forçados a bombear potássio para dentro da célula, postula-se que este gene estaria atuando na sobrevivência da forma miceliana de *P. brasiliensis*.

O gene *isc* codifica para uma proteína que está ligada ao resgate rápido de ferro mitocondrial e parece monitorar os níveis deste íon no citoplasma. O ferro é um fator

limitante para a infectividade durante a manifestação de várias micoses sistêmicas já que este componente existe em quantidades limitadas. Em *C. neoformans* (Jacobson *et al.*, 2005) e *S. cerevisiae*, dois genes que codificam para esta proteína foram descritos, sendo que, em *S. cerevisiae*, o duplo mutante negativo para os genes homólogos *ISU1* e *ISU2* demonstrou ser letal (Dutkiewicz *et al.*, 2004). O gene *isc* encontra-se super expresso em micélio de *P. brasiliensis* conforme dados mostrados na figura 13b, e pode estar envolvido no sensoriamento da quantidade de ferro no ambiente.

Outro gene altamente expresso em células de levedura de *P. brasiliensis* é o *pct* (Fig. 13b), um membro putativo da família de ATPases (E1-E2 Tipo-P). Estas proteínas são ATP-dependentes e regulam o fluxo de cátions, inclusive Na^+ , H^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} e K^+ (Smith *et al.*, 1993) para dentro da célula. Em *C. albicans*, os genes E1-E2 ATPase e CDR1, conferem resistência a cobre e a prata que são usados como agentes antimicrobianos (Riggle e Kumamoto, 2000). Uma função semelhante ao deste patógeno poderia ser atribuída ao gene *pct* expresso em *P. brasiliensis*.

5.2.4 – Genes de expressão diferencial envolvidos na organização celular (parede celular, membrana e citoesqueleto)

Para a categoria organização celular da parede, membrana e citoesqueleto, os genes selecionados *hex* e *bgl*, que codificam as proteínas peroxissomal hexagonal e 1,3 β -glucosidase, respectivamente, mostraram-se super expressos na forma de micélio (Fig. 13a). O gene *hex1* codifica uma proteína peroxissomal hexagonal que foi identificada em fungos filamentosos ascomicetos, tais como no patógeno de planta *Magnaporthe grisea* (Soundararajan *et al.*, 2004) e em *Neurospora crassa* (Jedd & Chua, 2000). Esta proteína é o principal constituinte do corpo de Woronin, uma organela associada à formação de poros nos septos (Trinci & Collinge, 1974; Markham & Colling, 1987). Uma das funções demonstradas para Hex1p é o fechamento de poros dos septos em resposta a danos celulares, evidenciando fortemente o seu envolvimento na manutenção da integridade celular (Jedd & Chua, 2000). Em *M. grisea*, mutantes para o gene *hex1* apresentam dificuldade de penetração no hospedeiro e mostram também inviabilidade para sobreviver na carência de fonte de nitrogênio *in vitro* (Soundararajan *et al.*, 2004). Já em *N. crassa*, mutantes *hex1* eliminam os corpos de Woronin do citoplasma o que resulta na lise celular, e as hifas exibem um fenótipo de extravasamento do citoplasma (Jedd & Chua, 2000). Os corpos de Woronin são

estruturas presentes nos peroxissomos que atuam na manutenção e integridade celular, e estão relacionados à virulência em fungos filamentosos (Jedd & Chua, 2000). Em *P. brasiliensis* provavelmente estas vesículas, altamente especializadas, estão envolvidas na proteção a danos celulares como também na sua sobrevivência durante crescimento, invasão e colonização do hospedeiro no processo de infecção. No entanto, investigações futuras são necessárias para elucidar a existência e o possível papel dos corpos de Woronin em *P. brasiliensis*.

Outro gene super expresso na forma de micélio (Fig. 13a) é o que codifica para 1,3- β -glucosidase, uma enzima que hidrolisa ligações O-glicosídicas das β -glucanas. As β -glucanas são polissacarídeos importantes encontrados preferencialmente na parede celular de micélio de *P. brasiliensis*, enquanto as α -glucanas predominam na parede das células leveduriformes (Kanetsuna & Carboenll, 1970). Uma hipótese formulada por Kanetsuna *et al.* (1972) e modificada por San-Blas e San-Blas (1985) explica a diferenciação de micélio para levedura e vice-versa baseado na modificação da composição da parede celular. A temperatura de 37°C há uma síntese aumentada de quitina e α -glucanas, e baixos níveis de β -glucanas, levando a formação de células leveduriformes. Em contraste, a 22°C, há uma diminuição na síntese de α -glucanas e, concomitantemente, o aparecimento de fibras longas de β -glucanas nos pontos de brotamento, o que leva a formação das hifas. Corroborando com estes eventos morfológicos e bioquímicos, há o aumento dos níveis de 1,3- β -glucosidase nas células micelianas.

Foram confirmados outros três genes que codificam para proteínas que pertencem a esta mesma categoria, porém super expressos em células leveduriformes: *ags* (α -1,3-glucana sintase); *cda* (quitina deacetilase) e *vrp*- verprolin (Fig. 13a). Em *P. brasiliensis* o gene *ags* que codifica para a enzima α -1,3-glucana sintase foi primeiramente descrito por Pereira *et al.* (2000). Recentemente, Marques *et al.* (2004) mostraram que este gene é super expresso em células de levedura deste patógeno, o que também foi confirmado em nossa análise do transcriptoma e validado por *northern blot*. Rappleye *et al.* (2004) mostraram que o silenciamento do gene *ags1* de *H. capsulatum*, via interferência por RNA, gerou leveduras significativamente menos virulentas e com menor capacidade de colonizar macrófagos de pulmão murino, ressaltando o papel da enzima α -glucana sintase (AGS1) na virulência deste patógeno. Em *C. neoformans*,

mutantes para este gene apresentam defeito na montagem da cápsula, um fator de virulência deste patógeno (Reese & Doering, 2003).

Em *P. brasiliensis*, a α -glucana é o principal polímero de glicose presente na fase de levedura constituindo 95% da parede celular (Kanetsuna *et al.*, 1972), e a sua síntese está diretamente associada ao ciclo de vida deste patógeno, por exemplo, baixos níveis de α -1,3-glucana na parede celular de leveduras são correlacionados à atenuação de virulência (Hallak *et al.*, 1982). Também foi observada a perda de virulência em culturas de *P. brasiliensis* após longo período de cultivo *in vitro*. Estas culturas apresentaram paredes mais finas, tendo sido observado, nesse caso, baixos níveis de α -1,3-glucana (San-Blas & San-Blas, 1977). Desta forma, este gene super expresso em células de levedura, provavelmente está envolvido na transição dimórfica e virulência deste patógeno, um importante alvo para o desenvolvimento de drogas antifúngicas.

A quitina deacetilase (CDA) catalisa a conversão de quitina a quitosana, através da deacetilação de resíduos de N-acetil-glucosamina. Quitosana é um polímero flexível, solúvel e constitui um importante componente da parede celular de algumas espécies fúngicas dentre elas *S. cerevisiae* (Zakrzewska *et al.*, 2005) e *C. neoformans* (Banks *et al.*, 2005). Em *S. cerevisiae* a produção de quitosana foi observada somente durante o processo de esporulação e dois genes de quitina deacetilase esporos específicos, *CDA1* e *CDA2*, foram descritos e caracterizados por Christodeulidou *et al.* (1996). Estes pesquisadores demonstraram a contribuição destes genes para a rigidez da parede dos esporos. Em *S. cerevisiae*, mutantes *cda1* apresentam a camada de quitosana mais difusa e menos compacta, enquanto a camada de superfície permanece intacta, já no mutante *cda2* a camada de quitosana não foi detectada. A parede dos esporos de ambos os mutantes, *cda1* e *cda2*, apresentam defeitos na maturação, que resultam na ausência das duas camadas mais externas que constituem o esporo. Em *C. neoformans*, estudos relataram a presença de quitosana na parede celular de leveduras e mutantes para o gene de quitina deacetilase leva a deficiência na produção de quitosana, interferindo no crescimento deste patógeno e conseqüentemente na capacidade de infectar o hospedeiro (Banks *et al.*, 2005), entretanto, em *P. brasiliensis*, até o momento não foi relatada a presença de quitosana. Bank *et al.*, 2005 mostraram a presença de níveis significativos de quitina na parede celular de leveduras de *C. neoformans* e que a maioria desta quitina está sendo deacetilada em quitosana. O gene que codifica para quitina deacetilase de *P. brasiliensis* encontra-se altamente expresso em células de levedura (Fig.13a) e apresenta

uma similaridade de 29% com o gene que codifica a quitina deacetilase de *C. neoformans*. Os genes que codificam para quitina deacetilase e quitina sintase em *P. brasiliensis* e em *C. neoformans* são alvos atrativos para a terapia antifúngica contra estes patógenos.

Finalmente, a verprolin está sendo descrita pela primeira vez em *P. brasiliensis*, sendo o gene *vrp* altamente expresso em células de levedura (Fig.13a). Esta proteína em *S. cerevisiae* está envolvida na distribuição polarizada da actina e conservação da viabilidade celular em altas temperaturas. Mutantes *vrp-1* de *S. cerevisiae* demonstraram incapacidade de crescer a 37°C (Naqvi *et al.*, 2001). Este gene pode estar relacionado a habilidade de crescimento de *P. brasiliensis* a 37°C, assim como, na participação e na organização do citoesqueleto das células de levedura. Considerando-se que o citoesqueleto celular exerce um papel crucial em processos fundamentais como crescimento, diferenciação e migração celular, crescimento localizado de membrana, endocitose e divisão celular (Drubin *et al.*, 1996) esta proteína pode ter um papel fundamental na manutenção da viabilidade celular de *P. brasiliensis* no hospedeiro.

A partir dos dados gerados por este trabalho, pode-se propor um modelo (Fig. 15) em que os genes envolvidos na organização celular, metabolismo de enxofre e transporte de íons apresentam uma expressão balanceada durante a transição celular de micélio para levedura. Neste modelo, enquanto α -glucana é sintetizada durante fase de levedura devido à expressão elevada de 1,3- α -glucan sintase, β -glucana é degradada pela ação de 1,3- β -glucosidase durante o crescimento das hifas. Além disso, a quitina deacetilase está provavelmente envolvida na síntese e remodelagem da parede celular das células de levedura, uma vez que é altamente expresso nesta fase e é provável que a quitosama faça parte da estrutura da parede celular deste patógeno. Genes relacionados ao fechamento do septo (*hex*) e organização do citoesqueleto (*vpr*) estão provavelmente envolvidos na estabilização e manutenção de micélio à temperatura ambiente e, de levedura a 37°C, respectivamente. O padrão de expressão diferencial de genes que controlam o transporte de potássio, ferro, cobre e enxofre sugere que estes genes possam estar envolvidos na adaptação do patógeno no ambiente e dentro do hospedeiro bem como, envolvidos na transição dimórfica e conseqüentemente na patogenicidade. Finalmente, as funções inferidas para estes genes só poderão ser comprovadas quando o silenciamento de genes, ou por nocaute ou por interferência de RNA (RNAi), estiver estabelecido. A importância destes genes no processo de transição dimórfica e

potencialmente no processo infectivo poderá conduzir a um melhor entendimento do ciclo biológico deste patógeno e indicar novas estratégias de tratamento da PCM.

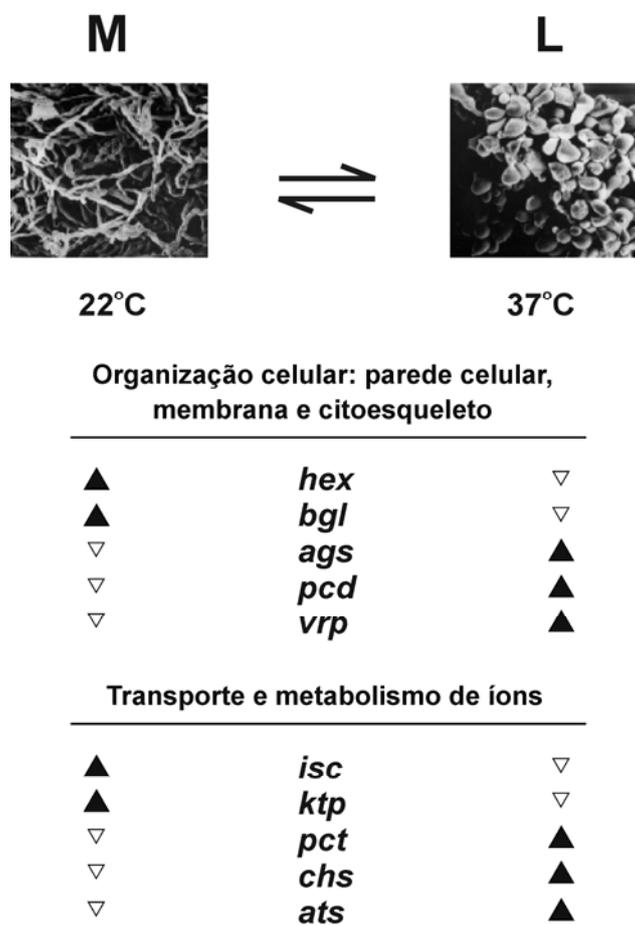


Figura 15. Genes envolvidos na organização celular (parede celular, membrana e citoesqueleto), no transporte de íons e no metabolismo de enxofre que foram identificados como super expressos em células de micélio (22°C) ou levedura (36°C) de *P. brasiliensis* (Microscopia Eletrônica, Silva *et al.*, 1999).

5.3 – Genes de expressão diferencial em *P. brasiliensis* e em outros fungos.

Outra análise realizada neste trabalho, foi a comparação entre o perfil de expressão diferencial de dois isolados de *P. brasiliensis*, Pb18 e o Pb01. Nesta análise, as 110 seqüências correspondentes aos genes diferencialmente expressos, identificados neste trabalho pela subtração *in silico* e microarranjo de cDNA no isolado Pb01, foram

comparadas com 41 seqüências diferencialmente expressas identificadas por macroarranjo de cDNA em levedura no isolado Pb18 (Marques *et al.* 2004). Destes genes, 15 mostraram comportamento igual de expressão nos dois isolados, considerando inclusive a forma de levedura onde a maior expressão foi observada (tabela 3). Ressalta-se aqui a identificação dos genes que codificam para colina sulfatase (metabolismo de enxofre), α -1,3-glucana sintase (organização celular) e ctr4 (*high affinity copper transport protein*).

Tabela 3 – Genes comuns identificados como diferencialmente expressos em Pb01 e em Pb18

PbAESTs	Anotação	Pb18	Categorias Funcionais
797	Choline sulfatase	CN247001	Metabolismo de enxofre
2198	High affinity copper transport protein ctr4	NP_587968.1	Transportador de íons
737	α -1,3-glucan synthase	AAL18964.1	Organização celular
1187	RNA-binding protein 8	CAD21082.1	Transcrição, tradução e estrutura ribossomal
165	Protein with 3 RNA binding domains	CAD21082.1	
1774	Hypothetical RNA-binding protein	CAD21082.1	
128	Probable c-4 methyl sterol oxidase	NP_011574.1	Metabolismo de carboidratos
1322	ketol-acid reductoisomerase	AAB67753.1	
1539	Enolase	Q12560	
1674	Aldolase	NP_012863.1	
2033	Glycine-rich protein	CAD21082.1	
5157	Fructose-bisphosphate aldolase	NP_012863.1	
2538	ADP,ATP carrier protein (ADP/ATP translocase) (adenine nucleotide translocator)	XP_327751.1	Outros
1873	Histone H4	P23751	
125	glycine cleavage system protein precursor	AAC61829.1	

Em adição, a comparação entre genes diferencialmente expressos em organismos diferentes podem elucidar mecanismos moleculares comuns responsáveis pela adaptação do parasita às novas condições ambientais e ao hospedeiro. A expressão gênica diferencial comparativa pode ser usada para gerar um modelo comum de infecção em diferentes patógenos. As complexas interações que são estabelecidas entre patógeno-hospedeiro caracterizam-se por alterações importantes na expressão gênica.

Neste contexto, uma análise comparativa entre os genes diferencialmente expressos determinados pelo microarranjo de cDNA de *P. brasiliensis* e microarranjo de cDNA de outros fungos pode evidenciar que o padrão de expressão destes genes pode ser conservado. Para esta análise os números de acessos das seqüências, fornecidos nos artigos já publicados na literatura mundial e considerados diferencialmente expressos pelos microarranjos, foram comparados com os genes identificados como diferenciais em micélio e levedura de *P. brasiliensis*. Nesta análise, 67 genes considerados diferencialmente expressos em *H. capsulatum* (Hwang *et al.*, 2003), sendo 30 genes induzidos somente na fase miceliana e 37 induzidos somente em levedura foram comparados. Destes 67 genes, 29 encontram-se descritos no transcriptoma de *P. brasiliensis* sendo que 18 destes mostraram-se diferencialmente expressos nestes dois patógenos na mesma forma, micélio ou levedura (tabela 4). Isto sugere que estes genes nestes fungos provavelmente estejam relacionados com processos celulares comuns, sob determinadas condições metabólicas de estresse nutricional, térmicos, durante processos de cultivo em diferentes condições e processos de diferenciação celular.

Tabela 4 – Genes comuns, diferencialmente expressos em *P. brasiliensis* e *H. capsulatum*, identificados por microarranjos de cDNA.

PbAESTs	Anotação	Forma da expressão diferencial	Categorias Funcionais
2946	PWP2 periodic tryptophan protein	M	Ciclo celular
5047	Interaction with the 19S regulatory particle of the 26S proteasome detected by coimmunoprecipitation	Y	Degradação de proteínas
1318	amino acid permease	M	Metabolismo de Aminoácido
3831	Serine hydroxymethyltransferase	Y	
5388	Gamma-glutamylcysteine synthetase	Y	
48	ATP-sulfurylase	Y	Metabolismo de enxofre
667	Adenylylsulfate kinase	Y	
797	choline sulfatase	Y	
3504	High affinity methionine permease	Y	
659	MAPKK Kinase	Y	Transdução de sinal
2891	Calcium/calmodulin-dependent serine-threonine-protein kinase	Y	
4523	homeodomain DNA-binding transcription factor	Y	Transcrição
3498	N-glycosyl-transferase	Y	Metabolismo de carbono
2859	Related to multifunctional cyclin-dependent kinase	Y	Síntese e processamento de mRNA
3964	ATP-dependent RNA helicase cdc28	Y	
627	U3 snoRNP protein	M	Síntese e maquinaria de processamento de rRNA
2615	sorbitol utilization protein	Y	Outros

Como pode ser visto na tabela 14 genes identificados nesta análise encontra-se diferencialmente expressos em levedura tanto em *P. brasiliensis* como *H. capsulatum*, onde a levedura é essencial para o estabelecimento da infecção. A expressão de genes aumentada nesta fase pode refletir a habilidade da levedura para adaptar-se ao novo ambiente e o seu crescimento durante a infecção. Neste contexto, vários genes envolvidos no metabolismo de enxofre encontrados no transcriptoma de *P. brasiliensis* e diferencialmente expressos apresentaram o mesmo comportamento em *H. capsulatum*, mostrando mais uma vez a importância desta via metabólica na manutenção da forma de levedura, pelo menos nestes dois fungos dimórficos (Medoff *et al.*, 1987; Hwang *et al.*, 2003). Além destes genes, outros envolvidos na transdução sinal, ciclo celular, metabolismo e maquinaria de síntese de proteína também apresentam uma similaridade na expressão diferencial nestes fungos. Esta análise comparativa entre estes dois patógenos, que apresentam ciclo de vida similar, foi realizada pela primeira vez. Esta análise pode nortear descobertas de genes que sejam comuns na estratégia de infecção destes patógenos humanos.

6 – CONCLUSÕES

1 - O Projeto Genoma Funcional e Diferencial do *P. brasiliensis* identificou 6.022 genes, considerando os dados gerados a partir das bibliotecas de cDNAs de micélio e levedura, o que cobriu cerca de 80% do conteúdo gênico (estimado em 8.000 genes), gerando um grande volume de informações sobre este patógeno. A análise do transcriptoma, pela subtração *in silico* e microarranjo de cDNAs, permitiu estabelecer um perfil diferencial de genes expressos em micélio e levedura. Juntas, estas duas estratégias metodológicas permitiram a identificação do total de 110 genes diferencialmente expressos.

2 – A análise global do transcriptoma revelou aspectos biológicos importantes deste patógeno através do relato de um grande número de genes envolvidos em diversos processos celulares como: virulência (28 genes); potenciais alvos para drogas (17 genes); vias de transdução sinal (37 genes); transportadores tipo MDR (20 genes); genes de choque térmico (48 genes); estresse oxidativo (23 genes), fornecendo subsídios para uma melhor compreensão da biologia deste e de outros fungos dimórficos, além da identificação de genes candidatos ao desenvolvimento de vacinas e novos alvos para drogas.

3 - Os resultados obtidos referentes às análises do perfil metabólico de carboidratos nas duas formas celulares de *P. brasiliensis* refletem provavelmente adaptações associadas com a forma de micélio (solo) e levedura (hospedeiro). As análises dos genes pertencentes às vias metabólicas permitiram inferir que este fungo é capaz de degradar aerobicamente o piruvato, através do ciclo do citrato e da cadeia de transporte de elétrons, bem como produzir energia em condição de anaerobiose parcial (forma de levedura), pela via do glioxilato ou pela utilização de uma via alternativa para converter o piruvato em etanol. Assim, o perfil transcricional da forma de micélio sugere uma tendência para o metabolismo aeróbico, enquanto a forma de levedura apresenta tendência para o metabolismo anaeróbico, o que é compatível com os baixos níveis de oxigênio dos tecidos infectados.

4 – O fato de ter sido demonstrado um desvio no metabolismo aeróbico, em micélio, para anaeróbico, em levedura, e o aumento da expressão dos genes para: *isocitrato liase* e *malato sintase*, em levedura, e *isocitrato desidrogenase* e *succinil-CoA* sintetase em micélio, mostrou que provavelmente a via do glioxilato esteja ativada em levedura enquanto que, em micélio, o ciclo do citrato é mais evidente.

5 - A super expressão dos genes que codificam para ATP sulfurilase, APS quinase, colina sulfatase em levedura, enzimas envolvidas no metabolismo de enxofre, especialmente na via de síntese *de novo* de cisteína, sugere a importância dessa via para o processo infectivo uma vez que está relacionada ao crescimento e diferenciação celular.

6 – A análise dos genes envolvidos na organização celular também apresentou um perfil de expressão diferencial. Os genes que codificam para a proteína peroxissomal hexagonal (*hex*) e 1,3 β -glucosidase encontram-se super expressos na forma miceliana, enquanto os genes que codificam para α -1,3- glucana sintase, quitina deacetilase e Verprolin são altamente expressos na forma de levedura. Uma vez que estes genes estão relacionados à manutenção, à estabilização e à integridade celular durante a transição dimórfica e conseqüentemente à virulência e patogenicidade destacam-se como potenciais alvos para o desenvolvimento de novas drogas.

7 - O perfil diferencial dos genes relacionados ao transporte de íons, *isc* (iron-sulfur cluster) e o *ktp* (transportador de cátion), super expressos na forma miceliana, e os genes *pct* (putative p-type cátion), em levedura, sugere a participação direta destes genes na adaptação do patógeno ao hospedeiro.

8 - O conhecimento de 80% do repertório genético deste fungo permite, a partir de agora, a seleção de clones contendo seqüências que poderão ser usadas na construção de vetores para o estudo de ruptura gênica e/ou RNAi em *P. brasiliensis* e conseqüentemente a comprovação da função destes genes e de sua relevância no processo de diferenciação celular e/ou infecção deste patógeno humano.

7 - PERSPECTIVAS

A anotação dos genes descritos no transcriptoma permitiu inferir informações importantes sobre os processos de diferenciação celular, patogenicidade e/ou virulência além de identificar possíveis novos alvos para drogas neste patógeno. No entanto, torna-se necessário uma comprovação da função biológica destes genes. Entre as perspectivas que podemos enumerar como conseqüências deste trabalho estão:

1 - A inexistência de um protocolo estabelecido para realizar experimentos que possam resultar na ruptura gênica em *P. brasiliensis* dificulta a validação funcional de genes neste patógeno. Entretanto, a presença de 5 ortólogos (*rrp-3*, *qde-2*, *sms-2*, *dcl-2* e *recq-2*) de *N. crassa* que codificam para proteínas envolvidas no processo de RNAi, reforça a possibilidade de que deve ocorrer o fenômeno de RNAi em *P. brasiliensis*. Dados recentes (Morais & Nóbrega, 2005) mostraram que o gene URA3 foi silenciado após transformação genética deste fungo. Além disso, com o desenvolvimento dos protocolos de transformação genética (Leal *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2005) os grupos que trabalham com este patógeno estão dedicando grandes esforços para estabelecer um bom sistema de RNAi em *P. brasiliensis*.

Desta forma, propomos como perspectiva para este trabalho a inativação por RNAi dos seguintes genes: *bgl*, *ags*, *pcd* envolvidos na organização da parede celular; *chs*, *ats* do metabolismo de enxofre e, *isc*, *ktp* e *pct* do transporte de íons, a qual pode confirmar o papel destes genes na diferenciação, virulência e patogenicidade de *P. brasiliensis*.

2 - Novas análises da expressão gênica utilizando os dados do transcriptoma e dos microarranjos de cDNA podem ser estendidas do *in vitro* para o *in vivo*. Genes envolvidos na interação patógeno-hospedeiro, incluindo os genes diferencialmente expressos em micélio e levedura, genes de choque térmico, genes essenciais, fatores de virulência e prováveis alvos para drogas podem ser analisados. De fato, o “mini-chip” do *P. brasiliensis* construído neste trabalho bem como os dados gerados aqui já estão sendo usados para analisar o padrão de expressão dos genes em células de *P. brasiliensis* após infecção de macrófagos. Estes dados abrirão a possibilidade da

comparação entre o padrão de expressão, *in vivo* e *in vitro*, de vários genes/proteínas envolvidos em diversos processos celulares importantes para o entendimento deste e de outros fungos patogênicos.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M. D., Kelley, J. M., Gocayne, J. D., Dubnick, M. *et al.* 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*. 252: 1651-1656.
- Albuquerque, P., Kyaw, C. M., Saldanha, R. R., Brigido, M. M., Felipe, M. S. S., Silva-Pereira, I. 2004. Pbhyd1 and Pbhyd2: two mycelium specific hydrophobin genes from the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol.* 41: 510-520.
- Albuquerque, P., Baptista, A. J, Derengowsky, L. S., Procópio, L., Nicola, A. M., Arraes, F. B. M., Souza, D. P., Kyaw, C.M., Silva-Pereira, I. 2005. *Paracoccidioides brasiliensis* RNA biogenesis apparatus revealed by functional genome analysis. *Genet Mol Res.* 4: 251-272.
- Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., Boldrick, J. C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J. I., Yang, L., Marti, G. E., Moore, T., Hudson, J. Jr., Lu, L., Lewis, D. B., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W. C., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Armitage, J. O., Warnke, R., Levy, R., Wilson, W., Grever, M. R., Byrd, J. C., Botstein, D., Brown, P. O. 2000. Staudt, L. M. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 403: 503-511.
- Altschul, S. F, Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.

- Akhter, S., McDade, H. C., Gorch, J. M., Heinrich, G., Cox, G. M., Perfect, J. R. 2003. Role of alternative oxidase gene in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 71: 5794-5802.
- Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E., Hochstein, P. 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78: 6858-6862.
- Amundson, S. A., Bittner, M., Chen, Y., Trent, J., Meltzer, P., Fornace, A. J. 1999. Fluorescent cDNA microarray hybridization reveals complexity and heterogeneity of cellular genotoxic stress responses. *Oncogene.* 18: 3666-3672.
- Aristizabal, B. H., Clemons, K. V., Cock, A. M., Restrepo, A., Stevens, D. A. 2002. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. *Med Mycol.* 40: 169-178.
- Aristizabal, B. H., Clemons K. V., Stevens, D. A., Restrepo, A. 1998. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. *Infect Immun.* 66: 5587-5591.
- Arraes, F. B. M., Benoliel, B., Burtet, R. T., Costa, P. L. N., Galdino, A. S., Lima, L. H. A., Marinho-Silva, C., Oliveira-Pereira, L., Pfrimer, P., Procópio-Silva, L., Reis, V. C. B., Felipe, M. S. S. 2005. General metabolism of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Genet Mol Res.* 4: 290-308.
- Arruda, C., Franco, M. F., Kashino, S. S., Nascimento, F. R., Fazioli, R. dos A., Vaz, C. A., Russo, M., Calich, V. L. 2002. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. *Clin Immunol.* 103: 185-195.
- Audic, S., Claverie, J. M. 1997. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res.* 7: 986-995.

- Aung, P. P., Oue, N., Mitani, Y., Nakayama, H., Yoshida, K., Noguchi, T., Bosserhoff, A. K., Yasui, W. 2005. Systematic search for gastric cancer-specific genes based on SAGE data: melanoma inhibitory activity and matrix metalloproteinase-10 are novel prognostic factors in patients with gastric cancer. *Oncogene*. 25: 2546-2557.
- Babior, B. M. 2000. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med*. 109: 33-44.
- Backer, M. D., Ilyina, T., Ma, X., Vandoninck, S., Luyten, W. H. M and Bossche, H. V. 2001. Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to Itraconazole treatment using a DNA microarray. *Antimicrob Agents Chemother*. 45: 1660-1670.
- Bagagli, E., Sano, A., Coelho, K. I., Alquati, S., Miyaji, M., Camargo, Z. P., Gomes, G. M., Franco, M., Montenegro, M. R. 1998. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of Paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg*, 58: 505-512.
- Bailek, R., Ibricevic, A., Fothergill, A., Begerow, D. 2000. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. *J Clin Microbiol*. 38: 3190-3193.
- Banks, I. R., Specht, C. A., Donlin, M. J., Gerik, K. J., Levitz, S. M., Lodge, J. K. 2005. A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. 4: 1902-1912.
- Baptista, A. J. 2004. Caracterização do gene *PbM32*, específico da fase miceliana do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. Instituto de Ciências Biológicas.
- Barbosa, M. S., Bao, S. N, Andreotti, P. F., de Faria, F. P., Felipe, M. S., dos Santos, F. L., Mendes-Giannini, M. J, Soares, C. M. 2006. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun*. 74: 382-389.

- Barbosa, M. S., Passos Cunha, D. A., Felipe, M. S. S., Jesuino, R. S. A., Pereira, M., Soares, C. M. A. 2004. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homologue is differentially regulated in phases of *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular and phylogenetic analysis. *Fungal Genet Biol.* 41: 667-675.
- Barker, K. S., Crisp, S., Wiederhold, N., Lewis, R. E., Bareither, B., Eckstein, J., Barbuch, R., Bard, M., Rogers, P. D. 2004. Genome-wide expression profiling reveals genes associated with amphotericin B and fluconazole resistance in experimentally induced antifungal resistant isolates of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother.* 54: 376-385.
- Basu, M., Czinn, S. J., Blanchard, T.G. 2004. Absence of catalase reduces long-term survival of *Helicobacter pylori* in macrophage phagosomes. *Helicobacter.* 9: 211-216.
- Bauer, D., Muller, H., Reich, J., Riedel, H., Ahrenkiel, V., Warthoe, P., Strauss, M. 1993. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res.* 21: 4272-4280.
- Baxevanis, A. D., Quellerie, B. F. 2001. Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins. 2nd edition, Wiley-Liss, Inc.
- Beecher, C. 2002. Metabolomics: A New “Omics” Technology. *American Genomics/Proteomics Technology.*
- Beil, S., Kehrl, H., James, P., Staudenmann, W., Cook, A. M., Leisinger, T., Kertesz, M. A. 1995. Purification and characterization of the arylsulfatase synthesized by *Pseudomonas aeruginosa* PAO during growth in sulfate-free medium and cloning of the arylsulfatase gene (*atsA*). *Eur J Biochem.* 229: 385-394.
- Belcher, C. E., Drenkow, J., Kehoe, B., Gingeras, T. R., Mcnamara, N., Lemjabbar, H., Basbaum, C., Relman, D. A. 2000. The transcriptional responses of respiratory

- epithelial cells to *Bordetella pertussis* reveal host defensive and pathogen counter-defensive strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 97: 13847-13852.
- Benard, G., Romano, C. C., Cacere, C. R., Juvenale, M., Mendes-Giannini, M. J., Duarte, A. J. 2001. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. 13: 248-252.
- Bennett, V., Baines, A. J. 2001. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev*. 81: 1353-1392.
- Bernardes, V. 2005. Utilização da seqüência *M51* como marcador molecular para diagnóstico da infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. Faculdade de Medicina.
- Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., Golani, I. 2001. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res*. 125: 279-284.
- Boon, K., Osorio, E. C., Greenhut, S. F., Schaefer, C. F., Shoemaker, J., Polyak, K., Morin, P. J., Buetow, K. H., Strausberg, R. L., De Souza, S. J., Riggins, G. J. 2002. An anatomy of normal and malignant gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 11287-11292.
- Borges, C. L., Pereira, M., Felipe, M. S., de Faria, F. P., Gómez, F. J., Deepe, G. S. Jr., Soares, C. M. 2005. The antigenic and catalytically active formamidase of *Paracoccidioides brasiliensis*: protein characterization, cDNA and gene cloning, heterologous expression and functional analysis of the recombinant protein. *Microbes Infect*. 7: 66-77.
- Braun, B. R., Head, W.S., Wang, M. X., Johnson, A. D. 2000. Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics*. 156: 31-44.

- Brazma, A., Vilo, J. 2001. Gene expression data analysis. *Microbes Infect* . 10: 823-829.
- Brown, M. P., Grundy, W. N., Lin, D., Cristianini, N., Sugnet, C.W., Furey, T.S., Ares, M. Jr., Haussler, D. 2000. Knowledge-based analysis of microarray gene expression data by using support vector machines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 262-267.
- Brown P. O., Botstein, D. 1999. Exploring the new world of the genomic with DNA microarrays. *Nature Genetics*. 21: 33-37.
- Brummer, E., Hanson, L. H., Restrepo, A., Stevens, D.A. 1988. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. *J Immunol*. 140: 2786-2789.
- Brummer, E., Castaneda, E., Restrepo, A. 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol. Rev*. 6: 89-117.
- Bulawa, C. E., Miller, D. W., Henry, L. K., Becker, J. M. 1995. Attenuated virulence of chitin-deficient mutants of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92: 10570-10574.
- Burgess, J. K. 2001. Gene expression studies using microarrays. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*. 28: 321-328.
- Burman, E. T., Westwater, C., Hube, B., Brown, A. J., Odds, F. C., Gow, N. A. 1998. Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 7670-7675
- Butchko, R. A., Brown, D. W., Proctor, R. 2005. *In silico* subtraction of *Fusarium verticillioides*. EST libraries to identify potential transcriptional regulators of the FUM gene cluster. Proceedings of the 23rd Fungal Genetics Conference. p 190.

- Calcagno, A. M., Ninõ-Vega, G., San Blas, F., San Blas, G. 1998. Geographic discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol.* 36: 1733-1736.
- Calich, V. L., Singer-Vermes, L. M., Siqueira, A. M., Burger, E. 1985. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br J Exp Pathol.* 66: 585-594.
- Calich, V. L., Kashino, S. S. 1998. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz. J Med Biol Res.* 31: 615-623.
- Cano, M. I. N., Cisalpino, P. S., Galindo, I., Ramirez, J. L., Mortara, R. A., Franco da Silveira, J. 1998. Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol.* 36: 742-747.
- Carvalho, M. J. A., Jesuino, R. S. A., Daher, B. S., Pereira, I. S., Freitas, S. M., Soares, C. M. A., Felipe, M. S. S. 2003. Functional and genetic characterization of calmodulin from the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol.* 39: 204-210.
- Casadevall A, Pirofski L. 2001. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis.* 184: 337-344.
- Castaneda, E., Brummer, E., Pappagianis, D., Stevens, D. A. 1998. Impairment of cellular but not humoral immune response in chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice. *Infect Immun.* 56: 1771-1777.
- Cataldo, L. M., Zhang, Y., Lu, J., Ravid, K. 1999. Rat NAP1: cDNA cloning and upregulation by Mpl ligand. *Gene.* 226: 355-364.
- Chen, S., Zhu, B., Yu, L. 2006. *In silico* comparison of gene expression levels in ten human tumor types reveals candidate genes associated with carcinogenesis. *Cytogenet Genome Res.* 112: 53-59.

- Burman, E. T., Westwater, C., Hube, B., Brown, A. J., Odds, F. C., Gow, N. A. 1998. Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 7670-7675
- Christodoulidou, A., Bouriotis, V. Thireos, G. 1996. Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 271: 31420–31425.
- Burman, E. T., Westwater, C., Hube, B., Brown, A. J., Odds, F. C., Gow, N. A. 1998. Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 7670-7675
- Cisalpino, P. S., Puccia, R., Yamauchi, L. M., Cano, M. J. N., da Silveira, J. F., Travassos, L. R. 1996. Cloning, characterization and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Biol Chem*. 271: 4553-4560.
- Colonna-Romano, S., Porta, A., Franco, A., Kobayashi, G. S., Maresca, B. 1998. Identification and isolation by DDRT-PCR of genes differentially expressed by *Histoplasma capsulatum* during macrophages infection. *Microb Pathog*. 25: 55-66.
- Cognetti, D., Davis, D., Sturtevant, J. 2002. The *Candida albicans* 14-3-3 gene, BMH1, is essential for growth. *Yeast*. 19: 55-67.
- Coutinho, Z. F., Silva, D., Lazera, M., Petri, V., Oliveira, R. M., Sabroza, P. C., Wanke, B. 2002. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad. Saúde Pública*. 18: 1441-1454.
- Cox, G. M., Harrison, T. S., McDade, H. C., Taborda, C. P., Heinrich, G., Casadevall, A., Perfect, J. R. 2003. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infect Immun*. 71: 173-180.

- Cox, G.M., McDade, H.C., Chen, S.C., Tucker, S.C., Gottfredsson, M., Wright, L.C., Sorrell, T.C., Leidich, S.D., Casadevall, A., Ghannoum, M.A. and Perfect, J.R. 2001. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* 39: 166-175.
- Cox, G. M., Mukherjee, J., Cole, G. T., Casadevall, A., Perfect, J.R. 2000. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun.* 68: 443-448.
- Cunha, A. F., Sousa, M. V., Silva, S. P., Jesuino, R. S. A., Soares, C. M. A., Felipe, M. S. S. 1999. Identification, N-terminal region sequencing and similarity analysis of differentially expressed proteins in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 37: 115-121.
- Dade, S., Callebaut, I., Paillison, A., Bontoux, M., Dalbies-Tran, R., Monget, P. 2004. In silico identification and structural features of six new genes similar to MATER specifically expressed in the oocyte. *Biochem Biophys Res Commun.* 324: 547-553.
- Daher, B. S., Venâncio, E. J., Freitas, S. M., Bão, S. N. Vianney, P. V. R., Andrade, R. V., Dantas, A. S., Soares, C. M.A., Pereira I. S., Felipe, M. S. S. 2005. The highly expressed gene *pby20* from *Paracoccidioides brasiliensis* encodes a flavodoxin-like protein. *Fungal Genetics and Biology.* 42: 434-443.
- De Brito, T., Franco, M. F. 1994. Granulomatous inflammation. *Rev Inst Med Trop.* São Paulo. 36: 185-192.
- Der, S. D., Zhou, A., Willians, B. R., Silverman, R. H. 1998. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 15623-15628.
- Derengowski L.S 2006. Análise da expressão gênica de potenciais fatores de virulência do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* submetido a diferentes condições experimentais. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. Instituto de Ciências Biológicas.

- Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D., Siebert, P. D. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 6025-6030.
- Diehn, M., Alizadeh, A., Rando, O. J., Liu, C. L., Stankunas, K., Botstein, D., Crabtree, G. R., Brow, P. 2002. Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 11796-11801.
- Diez, S., Gomez, B. L., McEwen, J. G., Restrepo, A., Hay, R. J., Hamilton, A.J. 2003. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant 27-kilodalton and purified 87-kilodalton antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*. 41: 1536-1542.
- Diniz, S. N., Reis, B. S., Goes, T. S., Zouain, C. S., Leite, M. F., Goes, A. M. 2004. Protective immunity induced in mice by F0 and FII antigens purified from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine*. 22: 485-492.
- Donson, J., Fang, Y., Espiritu-Santo, G., Xing, W., Salazar, A., Miyamoto, S., Armendarez, V., Volkmuth, W. 2002. Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. *Plant Mol Biol*. 48:75-97.
- Drubin, D. G. and Nelson, W. J. 1996. Origins of cell polarity. *Cell*. 84: 335-344.
- Dunham I. 2000. Genomics - the new rock and roll? *Trends Genet*. 16: 456-461.
- Dutkiewicz, R., Schilke, B., Cheng, S., Knieszner, H., Craig, E. A. Marszalek, J. 2004. Sequence-specific interaction between mitochondrial Fe-S scaffold protein Isu and Hsp70 Ssq1 is essential for their *in vivo* function. *J Biol Chem*. 279: 29167-29174.

- Enjalbert, B., Whiteway, M. 2005. Release from quorum-sensing molecules triggers hyphal formation during *Candida albicans* resumption of growth. *Eukaryot Cell*. 4: 1203-1210.
- Ewing, B., Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res*. 8: 186-194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C. Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res*. 8: 175-185.
- Falkow S. 2004. Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity – a personal recollection 15 years later. *Nature Rev Microbiol*. 2: 67-72.
- Fambrough, D., McClure, K., Kazlauskas, A., Lander, E. S. 1999. Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes. *Cell*. 97: 727-741.
- Fava-Netto, C. 1965. The immunology of South American blastomycosis. *Mycopathology* 26: 349-358.
- Feitosa, L. S., Cisalpino, P. S., dos Santos, M. R., Mortara, R. A., Barros, T. F., Morais, F. V., Puccia, R., da Silveira, J. F., de Camargo, Z. P. 2003. Chromosomal polymorphism, syntenic relationships and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol*. 39: 60-69.
- Felipe, M. S. S., Andrade, R. V., Arraes, F. B. M., Nicola, A. M., Maranhão, A. Q., Torres, F. A. G., Silva-Pereira, I., Poças-Fonseca, M. J., Campos, E. G., Moraes, L. M. P., Andrade, P. A., Tavares, A. H. F. P., Silva, S. S., Kyaw, C. M., Souza, D. P., PbGenome Network, Pereira, M., Jesuíno, R. S. A., Andrade, E. V., Parente, J. A., Oliveira, G. S., Barbosa, M. S., Martins, N. F., Fachin, A. L., Cardoso, R. S., Passos, G. A. S., Almeida, N. F., Walter, M. E. M. T., Soares, C. M. A., Carvalho, M. J. A., Brigido, M. M. 2005. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem*. 280: 24706-24714.

- Felipe, M. S. S., Andrade, R. V., Petrofeza, S. S., Maranhão, A. Q., Torres, F. A. G., Albuquerque, P., Arraes, F. B., Arruda, M., Azevedo, M. O., Baptista, A. J., Bataus, L. A. M., Borges, C. L., Campos, E. G., Cruz, M. R., Daher, B. S., Dantas, A., Ferreira, M. A., Ghil, G. V., Jesuíno, R. S., Kyaw, C. M., Leitão, L., Martins, C. R., Moraes, L. M., Neves, E. O., Nicola, A. M., Alves, E. S., Parente, J. A., Pereira, M., Poças-Fonseca, M. J., Resende, R., Ribeiro, B. M., Saldanha, R. R., Santos, S. C., Silva-Pereira, I., Silva, M. A., Silveira, E., Simões, I. C., Soares, R. B., Souza, D. P., De-Souza, M. T., Andrade, E. V., Xavier, M. A., Veiga, H. P., Venâncio, E. J., Carvalho, M. J., Oliveira, A. G., Inoue, M. K., Almeida, N. F., Walter, M. E., Soares, C. M. A., Brigido, M. M. 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast*. 20: 263-271.
- Fiehn O. 2002. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*. 48: 155-171.
- Fillmore, G. C., Lin, Z., Bohling, S. D., Robetorye, R. S., Kim, C., Jenson, S. D., Elenitoba-Johnson, K. S. J., Lim, M. S. 2002. Gene expression profiling of cell lines derived from T-cell malignancies. *FEBS Letters*. 522: 183-188.
- Finlay, B.B., Falkow, S. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol Biol Rev*. 61: 136-169.
- Fonseca, C.A., Jesuíno, R.S.A., Felipe, M.S.S., Cunha, D.A., Brito, W.A. and Soares, C.M.A. 2001. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis* . *Microbes Infect*. 3: 535-542.
- Fornari, M. C., Bava, A. J., Guerenó, M. T., Berardi, V. E., Silaf, M. R., Negroni, R., Diez, R. A. 2001. High serum interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha levels in chronic paracoccidioidomycosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 8: 1036-1038.
- Franco, M. 1987. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol*. 25:5-15.

- Franco, M., Peracoli, M. T., Soares, A., Montenegro, R., Mendes, R. P., Meira, D. A. 1993. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol.* 5: 115-149.
- Fraser, J. A., Davis, M. A., Hynes, M. J. 2001. The formamidase gene of *Aspergillus nidulans*: regulation by nitrogen metabolite repression and transcriptional interference by an overlapping upstream gene. *Genetics.* 157: 119-131.
- Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 64: 97-112.
- Furtado, J. S., de Brito, T., Freymuller, E. 1967. The structure and reproduction of *Paracoccidioides brasiliensis* in human tissue. *Sabouraudia.* 5: 226-229.
- Geiss, G. K., Bumgarner, R. E., An, M. C., Agy, M. B., Van'T Wout, A. B., Hammersmark, E., Carter, V. S., Upchurch, D., Mullins, J. I., Katze, M. G. 2000. Large-scale monitoring of host cell gene expression during HIV-1 infection using cDNA microarrays. *Virology.* 266: 8-16.
- Gibas, C., Jambeck, P. 2001. Developing Bioinformatics Computer Skills. Lorrie Lejeune.
- Ghannoum, M.A. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol Rev.* 13: 122-143.
- Goldani, L. Z., Sugar, A. M. 1998. Short report: use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* 58: 152-153.
- Goldman, G. H., dos Reis Marques, E., Duarte Ribeiro, D. C., de Souza Bernardes, L. A., Quiapin, A. C., Vitorelli, P. M., Savoldi, M., Semighini, C. P., de Oliveira, R. C., Nunes, L. R., Travassos, L. R., Puccia, R., Batista, W. L., Ferreira, L. E., Moreira, J. C., Bogossian, A. P., Tekaia, F., Nóbrega, M. P., Nobrega, F. G.,

- Goldman, M. H. 2003. 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*. 2: 34-48.
- Goldway, M., Teff, D., Schmidt, R., Oppenheim, A. B., Koltin, Y. 1995. Multidrug resistance in *Candida albicans*: disruption of the BENr gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 39: 422-426.
- Golub, T. R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J. P., Coller, H., Loh, M. L., Downing, J. R., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D., Lander, E. S. 1999. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 286: 531-537.
- Gozalbo, D., Patricia, R., Villamón, E. and María, L.G. 2004. *Candida* and candidiasis: The cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy. *Curr Drug Target Infect Disord*. 4: 117-135.
- Graham, J. E., Clark-Curtiss, J. E. 1999. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 11554-11559.
- Graves, P. R., Haystead, T.A. 2002. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 66: 39-63.
- Green, E. D. 2001. Strategies for the systematic sequencing of complex genomes. *Genetics*. 2: 553-583.
- Green P. 1996. PHRAP documentation. University of Washington, Seattle, USA. <http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>
- Gregory, P. D., Wagner, K., Horz, W. 2001. Histone acetylation and chromatin remodeling. *Exp Cell Res*. 265: 195-202.

- Grouse, L. H., Munson, P. J., Nelson, P. S. 2001. Sequence databases and microarrays as tools for identifying prostate cancer biomarkers. *Urology*. 57: 154-159.
- Grosso, D. M., Almeida, S. R., Mariano, M., Lopes, J. D. 2003. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. *Infect Immun*. 71: 6534-6542.
- Gueho, E., Leclerc, M. C., Hoog, G. S., Dupont, B. 1997. Molecular taxonomy and epidemiology of *Blastomyces* and *Histoplasma* species. *Mycoses* . 40:69-81.
- Hahn, R. C., Morato Conceição, Y. T., Santos, N. L., Ferreira, J. F., Hamdan, J. S. 2003. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and *in vitro* resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. *Mycoses*. 46: 342-347.
- Hallak, J., San-Blas, F., San-Blas, B. 1982. Isolation and wall analysis of dimorphic mutants of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouradia*. 20: 51-62.
- Hamdan, J. S., Resende, M. A., Cunha, A. L., Alves, E. O. Cisalpino, E. O. 1993. Partial biochemical characterization of five *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Current Microbiology*. 27: 91-95.
- Heller, R. A., Schena, M., Chai, A., Shalon, D., Bedilion, T., Gilmore, J., Wooller, D. E., Davis, R. W. 1997. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94: 2150-2155.
- Huang, X., Madan A. 1999. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. *Genome Res*. 9: 868-877.
- Huh, W.K., Kang, S.O. 1999. Molecular cloning and functional expression of alternative oxidase from *Candida albicans*. *J Bacteriol*. 181: 4098-4102.
- Huh, W.K. & Kang, S.O. 2001. Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. *Biochem J*. 356: 595-604.

- Hwang, C. S., Rhie, G. E., Oh, J. H., Huh, W. K., Yim, H. S., Kang, S. O. 2002. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology*. 148: 3705-3713.
- Hwang, H., Hocking-Murray, D., Bahrami, A. K., Andersson, M., Rine, J., Sil, A. 2003. Identifying phase-specific genes in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum* using a genomic shotgun microarray. *Mol Biol Cell*. 14: 2314-2326.
- Ibrahim, A.S., Mirbod, F., Filler, S.G., Banno, Y., Cole, G.T., Kitajima, Y., Edwards, J.E. Jr, Nozawa, Y., Ghannoum, M.A. 1995. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun*. 63: 1993-1998.
- Igarashi, M., Kitada, Y., Yoshiyama, H., Takagi, A., Miwa, T., Koga, Y. 2001. Ammonia as an accelerator of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis of gastric epithelial cells in *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immun*. 69: 816-821.
- Iwata, M., Graf, L., Awaya, N., Torok-Storb, B. 2002. Functional interleukin-7 receptors (IL-7Rs) are expressed by marrow stromal cells: binding of IL-7 increases levels of IL-6 mRNA and secreted protein. *Blood*. 100: 1318-1324.
- Iyer, V. R., Eisen, M. B., Ross, D. T., Schuler, G., Moore, T., Lee, J., Trent, J. M., Staudt, L. M., Hudson, J., Boguski, M. S., Lashkari, D., Shalon, D., Botstein, P. O. 1999. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science*. 283:83-87.
- Jacobson, E. S., Troy, A. J., Nyhus, K. J. 2005. Mitochondrial functioning of constitutive iron uptake mutations in *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*. 159:1-6.
- Jacquemin, P., Sapin, V., Alsat, E., Evain-Brion, D., Dolle, P., Davidson, I. 1998. Differential expression of the TEF family of transcription factors in the murine

- placenta and during differentiation of primary human trophoblasts *in vitro*. *Dev Dyn*. 212: 423-436.
- Jedd, G., Chua, N. H. 2000. A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nat Cell Biol*. 2: 226–231.
- Jesuino, R. S. A., Azevedo, M. O., Felipe, M. S. S., Pereira, M., Soares, C.M.A. 2002. Characterization of a chaperone ClpB homologue of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast*. 19: 963-972.
- Johnson, C.H., Prigge, J.T., Warren, A.D., McEwen, J.E. (2003) Characterization of an alternative oxidase activity of *Histoplasma capsulatum*. *Yeast*. 20: 381-388.
- Jordan, B. R. 1998. Large-scale expression measurement by hybridization methods: from high-density membranes to "DNA chips". *Journal of Biochemistry*. 124: 251-258.
- Kaminski, N., Allard, J. D., Pittet, J. F., Zuo, F., Griffiths, M. J., Morris, D., Huang, X., Sheppard, D., Heller, R. A. 2000. Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 1778-1783.
- Kandror, O., Bretschneider, N., Kreydin, E., Cavalieri, D., Goldberg, A.L. 2004. Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn 2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Mol Cell*. 13: 771-781.
- Kanetsuna, F., Carbonell, L.M., Moreno, R.E., Rodriguez, J. 1969. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol*. 97: 1036-1041.
- Kanetsuna, F., Carbonell, L. M. 1970. Cell wall Glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol*. 101: 675-680.

- Kanetsuna, F., Carbonell, L. M., Azuma, I., Yamamura, Y. 1972. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol.* 110: 208-218.
- Kashino, S. S., Fazioli, R. A., Cafalli-Favati, C., Meloni-Bruneri, L. H., Vaz, C. A., Burger, E., Singer, L. M., Calich, V. L. 2000. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. *J Interferon Cytokine Res.* 20: 89-97.
- Kasuga, T., T. J. White, J. W. Taylor. 2002. Estimation of nucleotide substitution rates in Eurotiomycete fungi. *Mol Biol Evol.* 19: 2318–2324.
- Kawasaki, L., Wysong, D., Diamond, R., Aguirre, J. 1997. Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J Bacteriol.* 179: 3284-3292.
- Kim, J., Cheon, S. A, Park, S., Son, Y., Kim, J. 2000. Serum-induced hypha formation in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Lett.* 190: 9-12.
- Kraus, P. R., Boily, M. J., Giles, S. S., Stajich, J. E., Allen, A., Cox, G. M., Dietrich, F. S., Perfect, J. R., Heitman, J. 2004. Identification of *Cryptococcus neoformans* Temperature-Regulated Genes with a Genomic-DNA Microarray. *Eukaryot Cell.* 3: 1249–1260.
- Kudoh, K., Ramanna, M., Rayatn, R., Elkahloun, A. G., Bittner, M. L., Meltzer, P. S., Trent, J. M., Dalton, W. S., Chin, K. V. 2000. Monitoring the expression profiles of doxorubicin-induced and doxorubicin-resistant cancer cells by cDNA microarray. *Cancer Research.* 60: 4161-4166.
- Kurella, M., Hsiao, L., Yoshida, T., Randall, D. J., Chow, G., Sarang, S. S., Jensen, V. R., Gullans, R. S. 2001. DNA Microarray Analysis of complex Biologic Process. *Journal of the American Society of Nephrology.* 12: 72-78.

- Kwon-Chung, K. 1998. Gene disruption to evaluate the role of fungal candidate virulence genes. *Curr Opin Microbiol.* 1: 381-389.
- Lacaz, C. S. 1994. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy. In: Franco. M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno, A., Del Negro, G. eds. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press, 13-25.
- Lander, E. S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C. *et al.* 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 409: 860-921. Erratum in: *Nature* 2001 Aug 2,412(6846):565. *Nature.* 411:720.
- Leal, C. V., Montes, B. A., Mesa, A. C., Rua, A. L., Corredor, M., Restrepo, A., McEwen, J. G. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 42: 391-395.
- Leidich, S.D., Ibrahim, A.S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., Fonzi, W., Mirbod, F., Nakashima, S., Nozawa, Y. and Ghannoum, M.A. (1998). Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem.* 273: 26078-26086.
- Lengeler, K. B., Davidson, R. C., D'souza, C., Harashima, T., Shen, W.C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M., Heitman, J. 2000. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64: 746-785.
- Liang, P., Averboukh, L., Pardee, A. B. 1993. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res.* 21: 3269-3275.
- Liang, P., Pardee, A. B. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science.* 257: 967-971.
- Li, D. and Lu, G. X. 2004. Identification and expression of a novel human testis-specific gene by digital differential display. *Chin Med J.* 117: 1791-1796.

- Liu, T. T., Lee, R. E., Barker, K. S., Lee, R.E., Wei, L., Homayouni, R., Rogers, P. D. 2005. Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 2226-2236.
- Loose, D. S., Price Stover, E., Restrepo, A., Stevens, D. A., Feldman, D. 1983. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80: 7659-7663.
- Lorenz, M. C., Fink, G. R. 2001. The glyoxilate cycle is required for fungal virulence. *Nature.* 412: 83-86.
- Lynch, M. 2006. The origins of eukaryotic gene structure. *Mol Biol Evol.* 23: 450-468.
- Manns, B. J., Baylis, B. W., Urbanski, S. J., Gibb, A. P., Rabi, H. R. 1996. Paracoccidioidomycosis: case report and review. *Clin Infect Dis.* 23: 1026–1032.
- Markham, P. and Collinge, A. J. 1987. Woronin bodies in filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 46: 1–11.
- Marluf, G.A. 1997. Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. *Annu Rev Microbiol.* 51: 73-96.
- Marques, E. R., Ferreira, M. E. S., Drummond, R. D., Felix, J. M., Menossi, M. , Savoldi, M., Travassos, L. R., Puccia, R., Batista, W. L., Carvalho, K. C., Goldman, M. H. S., Goldman, G. H. 2004. Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. *Mol Genet Genomics.* 271: 667-677.

- Marques, S. A., Robles, A. M., Tortorano, A. M., Tuculet, M. A., Negroni, R., Mendes, R. P. 2000. Mycoses associated with AIDS in the Third World. *Med Mycol.* 38: 269-279.
- Matsumura, H., Nirasawa, S., Terauchi, R. 1999. Technical advance: transcript profiling in rice (*Oryza sativa L.*) seedlings using serial analysis of gene expression (SAGE). *Plant J.* 20: 719-726.
- Matute, D. R., McEwen, J. G., Puccia, R., Montes, B. A., San-Blas, G., Bagagli, E., Rauscher, J.T., Restrepo, A., Morais, F., Nino-Vega, G., Taylor, J. W. 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol.* 23: 65-73.
- McEwen, J. G., Bedoya, V., Patino, M. M., Salazar, M. E., Restrepo, A. E. 1987. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol.* 25: 165-175.
- McEwen, J. G., Garcia, A. M., Ortiz, B. L., Botero, S., Restrepo, A. 1995. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res.* 26: 305–306.
- McEwen, J. G., Ortiz, B. L., Garcia, A. M., Florez, A. M., Botero, S., Restrepo, A. 1996. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol.* 20: 125-131.
- Medoff, G., Painter, A., Kobayashi, G. S. 1987. Mycelial- to yeast-phase transitions of the dimorphic fungi *Blastomyces dermatitidis* and *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol.* 169: 4055-4060.
- Mio, T., Kokado, M., Arisawa, M., Yamada-Okabe, H. (2000). Reduced virulence of *Candida albicans* mutants lacking the GNA1 gene encoding glucosamine-6-phosphate acetyltransferase. *Microbiology.* 146: 1753-1758.

- Mirbod, F., Nakashima, S., Nozawa, Y., Ghannoum, M.A. 1998. Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem*. 273: 26078-26086.
- Missall, T.A., Lodge, J.K., McEwen, J.E. 2004. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryot Cell*. 3: 835-846.
- Mohler, P. J., Gramolini, A. O., Bennett, V. 2002. Ankyrins. *J Cell Sci*. 15: 1565-1566.
- Molinari-Madlum, E. E., Felipe, M. S. S., Soares, C. M. A. 1999. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Med Mycol*. 37: 269-276.
- Montoya, A. E., M. N. Moreno, A. Retrepo, and J. G. McEwen 1997. Electrophoretic karyotype of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol*. 21: 223-227.
- Montoyama, A. B., Venâncio, E. J., Brandão, G. O., Perofeza-Silva, S, Pereira, I. S., Soares, C. M. A., Felipe, M. S. S. 2000. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA. *J Clin Microbiol*. 38: 3106-3109.
- Morais, F. V. 2005. Electrotransformation of *Paracoccidioides brasiliensis*: The challenge of gene replacement and RNA interference. Abstract. *Rev Inst Med Trop*. IX International meeting on Paracoccidioidomycosis.
- Morais, F. V., T. F. Barros, M. K. Fukada, P. S. Cisalpino, R. Puccia. 2000. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol*. 38: 3960-3966.
- Moraitis, C., Curran, B. P. 2004. Reactive oxygen species may influence the heat shock response and stress tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 21: 313-323.

- Moreira, S. F. I., Bailão, A. M., Barbosa, M. S., Jesuíno, R. S. A., Felipe, M. S. S., Pereira, M., Soares, C. M. A. 2004. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis. *Yeast*. 30: 173-182.
- Mosch, H. U., Kubler, E., Krappmann, S., Fink, G. R., Braus, G. H. 1999. Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 10: 1325-1335.
- Mota, N. G., Peracoli, M. T., Mendes, R. P., Gattass, C. R., Marques, S. A., Soares, A. M., Izatto, I. C., Rezkallah-Iwasso, M. T. 1988. Mononuclear cell subsets in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol*. 26: 105-111.
- Motta, T. R., Moreira-Filho, C. A., Mendes, R. P., Souza, L. R., Sugizak, M. F., Baueb, S., Calich, V. L., Vaz, C. A. 2002. Evaluation of DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers (RAPD) as genetically associated elements to differentiate virulent and non-virulent *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 33: 151-157.
- Mukherjee, P. K.; Seshan, K. R.; Leidich, S. D.; Chandra, J.; Cole, G. T.; Ghannoum, M. A. 2001. Reintroduction of the PLB1 gene into *Candida albicans* restores virulence in vivo. *Microbiology*. 147: 2585-2597.
- Naiff, R. D., Ferreira, L. C. P., Barte, T. V., Arias, J. R. 1986. Paracoccidioidomicose enzoótica em tarus (*Daypus novemcinctus*) no Estado do Pará. *Ver. Inst Med Trop. São Paulo*. 28: 19-27.
- Nantel, A., Dignard, D., Bachevich, C., Harcus, D., Marcil, A., Bouin, A. P., Sensen, C. W., Hogues, H., Hoog, M. V. H., Gordon, P., Rigby, T., Benoit, F., Tessier, D. C., Thomas, D. Y., Whiteway, M. 2002. Transcription profiling, of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Mol Biol Cell*. 13: 3452-3465.

- Naqvi, S. N., Feng, Q., Boulton, V. J., Zahn, R., Munn, A. L. 2001. Vrp1p functions in both actomyosin ring-dependent and Hof1p-dependent pathways of cytokinesis. *Traffic*. 2:189-201.
- Nascimento, E., Martinez, R., Lopes, A. R., de Souza Bernardes, L. A., Barco, C. P., Goldman, M. H., Taylor, J. W., McEwen, J. G., Nóbrega, M. P., Nóbrega, F. G., Goldman, G. H. 2004. Detection and selection of microsatellites in the genome of *Paracoccidioides brasiliensis* as molecular markers for clinical and epidemiological studies. *J Clin Microbiol*. 42: 5007-5014.
- Nathan, C., Shiloh, M. U. 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 8841-8848.
- Nicola, A. M., Andrade, R. V., Silva-Pereira, I. 2005. Molecular chaperones in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet Mol Res*. 4:346-357.
- Nino-Vega, G. A., Calcagno, A. M., San-Blas, G., San-Blas, F., Gooday, G. W., Gow, N. A. 2000. RFLP analysis reveals marked geographical isolation between strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 38: 437-441.
- Nino-Vega, G. A., Burman E. T., Gooday G. W., San-Blas G., Gow N. A. 1998. Molecular cloning and sequencing of a chitin synthase gene (CHS2) of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast* 14:181-187.
- Nittler, M. P., Hocking-Murray, D., Foo, C. K., Sil, A. 2005. Identification of *Histoplasma capsulatum* transcripts induced in response to reactive nitrogen species. *Mol Biol Cell*. 16: 4792-4813.
- Notebaart, R.A., Huynen, M. A., Teusink, B., Siezen, R. J., Snel, B. 2005. Correlation between sequence conservation and the genomic context after gene duplication. *Nucleic Acids Res*. 33:6164-6171. Erratum in: *Nucleic Acids Res*. 33: 7176.

- Odds, F. C., Brown, A. J. P., Gow, N. A. R. 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 11: 272-279
- Odds, F. C., Gow, N. A., Brown, A. J. 2001. Fungal virulence studies come of age. *Genome Biol.*;2:REVIEWS1009.
- Okazaki, Y., Furuno, M., Kasukawa, T. 2002. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature.* 420: 563-573.
- Oue, N., Aung, P. P., Mitani, Y., Kuniyasu, H., Nakayama, H., Yasui, W. 2005. Genes involved in invasion and metastasis of gastric cancer identified by array-based hybridization and serial analysis of gene expression. *Oncology.* 69 Suppl 1: 17-22.
- Paillisson, A., Dadé, S., Callebaut, I., Bontoux, M., Dalbiès-Tran, R., Vaiman, D., Monget, P. 2005. Identification, characterization and metagenome analysis of oocyte-specific genes organized in clusters in the mouse genome. *BMC Genomics.* 6: 76.
- Pandey, A., Mann, M. 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature.* 405: 837-846.
- Paris, S.; Duran, S. 1985. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate (cAMP) and dimorphism in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* 92: 115-120.
- Park, J. Y., Kim, D. H., Shin, W. S., Seo, H. S., Kim, K., Lee, K. H., Koh, C. M., Bong, J. P. 2003. Search for genes potentially related to germ tube formation in *Candida albicans* by differential-display reverse transcription polymerase chain reaction. *Yonsei Med J.* 44: 110-118.
- Passos, G. A. S., Nguyen, C., Jordan, B. 2000. Projeto Transcriptoma. Análise da Expressão Gênica em Larga Escala Usando DNA – Arrays. *Biotechnology Ciência & Desenvolvimento.* 34-37.

- Pereira, M., Felipe, M. S. S., Brígido, M. M., Soares, C. M. A., Azevedo, M. O. 2000. Molecular cloning and characterization of a glucan synthase gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast*. 16: 451-462.
- Pereira, L. A., Pereira, M., Felipe, M. S. S., Zancopé-Oliveira, R., Soares, C. M. A. 2004. Proteomic identification, nucleotide sequence, heterologous expression and immunological reactivity of the triosephosphate isomerase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 6: 892-900.
- Peterson, S. W. Sigler, L. 1998. Molecular genetic variation in *Emmosia crescens* and *Emmosia parva*, etiologic agent of adiaپیromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. *J Clin Microbiol.* 36: 2918-2925.
- Pinto, A. R., Puccia, R., Diniz, S. N., Franco, M. F., Travassos, L. R. 2000. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine* 18: 3050-3058.
- Piper, P.W., Ortiz-Calderon, C., Holyoak, C., Coote, P. and Cole, M. 1997. Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H(+)-ATPase. *Cell Stress Chaperones*. 2: 12-24.
- Popi, A. F., Lopes, J. D., Mariano, M. 2002. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol.* 218: 87-94.
- Puccia, R., Juliano, M. A., Juliano, L., Travassos, L. R., Carmona, A. K. 1999. Detection of the basement membrane-degrading proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis* after SDS-PAGE using agarose overlays containing Abz-MKALTLQ-EDDnp. *Braz J Med Biol Res.* 32: 645-649.
- Quackenbush, J. 2002. Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet.* 32 Suppl:496-501.

- Rapplee, C. A., Engle, J. T., Goldman, W. E. 2004. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for α -(1,3)-glucan in virulence. *Mol Microbiol.* 53: 153–165.
- Reese, A. J., Doering, T. L. 2003. Cell wall alpha-1,3-glucan is required to anchor the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Mol Microbiol.* 50: 1401-1409.
- Reinoso, C., Nino-Vega, G., San Blas, G., Domínguez, A. 2005. Random sequencing of *Paracoccidioides brasiliensis* genes. *Med Mycol.* 43:681-689.
- Restrepo, A. 1985. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouradia.* 23: 323-334.
- Restrepo, A. 1994. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo, M. & Del Negro, G. *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Raton, Flórida. Pp. 121-130.
- Restrepo, A., Jimenez, B. E. 1980. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *J Clin Microbiol.* 12: 279-281.
- Restrepo, A., McEwen, J. G., Castañeda, E. 2001. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol.* 39:233-241.
- Restrepo, A., Salazar, M. E., Cano, L. E., Stover, E. P., Feldman, D., Stevens, D. A. 1984. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* 46: 346-353.
- Ricci, G., Mota, F. T., Wakamatsu, A., Serafim, R. C., Borra, R. C., Franco, M. 2004. Canine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 42: 379-383.
- Riggle, P. J. and Kumamoto, C. A. 2000. Role of a *Candida albicans* P1-Type ATPase in resistance to copper and silver ion toxicity. *J Bacteriol.* 182: 4899-4905.

- Rindi, L., Lari, N., Garzelli, C. 1999. Search for genes potentially involved in *Mycobacterium tuberculosis* virulence by mRNA differential display. *Biochem Biophys Res Commun.* 258: 94-101.
- Rhodes, J. C., Oliver, B. G., Askew, D. S., Amlung, T. W. 2001. Identification of genes of *Aspergillus fumigatus* up-regulated during growth on endothelial cells. *Med Mycol.* 39: 253-260.
- Rochfort, S. 2005. Metabolomics reviewed: a new "omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research. *J Nat Prod.* 68: 1813-1820.
- Roemer, T., Jiang, B., Davison, J., Ketela, T., Veillette, K., Breton, A., Tandia, F., Linteau, A., Sillaots, S., Marta, C., Martel, N., Veronneau, S., Lemieux, S., Kauffman, S., Becker, J., Storms, R., Boone, C. and Bussey, H. 2003. Large-scale essential gene identification in *Candida albicans* and applications to antifungal drug discovery. *Molecular Microbiology.* 50:167-181.
- Romani, L. 1997. The T cell response against fungal infections. *Curr Opin Immunol.* 9:484-490.
- Romero, P., Wagg, J., Green, M. L., Kaiser, D., Krummenacker, M., Karp, P. D. 2005. Computational prediction of human metabolic pathways from the complete human genome. *Genome Biol.* 6:R2. Epub 2004 Dec 22.
- Romualdi, C., Bortuzzi, S., D'Alessi, F. Daniele, G. A. 2003. IDEG6: a web tool for detection of differentially expressed genes in multiple tag sampling experiments. *Physiol. Genomics.* 2: 159-162.
- Rougemont, J. and Hingamp, P. 2003. DNA microarray data and contextual analysis of correlation graphs. *BMC Bioinformatics.* 2003. 4:15.
- Rubtsov, A. M., Lopina, O. D. 2000. Ankyrins. *FEBS Lett.* 482: 1-5.

- Rude, T. H., Toffaletti, D. L., Cox, G. M., Perfect, J. R. 2002. Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 70: 5684-5694.
- Saffer, L. D., Schwartzman, J. D. 1991. A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration. *J Protozool.* 38: 454-460.
- Saier, M. H. Jr. 2000. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 354-411.
- Salem-Izacc, S. M., Gómez, F. J., Jesuino, R. S. A., Fonseca, C. A, Felipe, M. S. S., Deep Jr., G. S., Soares, C. M. A. 2000. Molecular cloning, characterization and expression of a gene encoding the heat shock protein 60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medical Mycology.* 39: 445-455.
- Salem-Izacc, S. M., Jesuino, R. S. A., Brito, W. A., Pereira, M., Felipe, M. S. S., Soares, C. M. A. 1997. Protein synthesis patterns of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in stage-specific forms and during cellular differentiation. *J Med Vet Mycol.* 35: 205-211.
- San-Blas, F., San-Blas, G., Gil, F. 1994. Production and regeneration of protoplasts from the Y-phase of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol.* 32: 381-388.
- San Blas, G. 1985. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall glucans, pathogenicity, and dimorphism. *Curr Top Med Mycol.* 1: 235-257.
- San Blas, G. 1993. Paracoccidioidomycosis and Etiologic Agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycology.* 31: 99-113.
- San Blas, G., Nino-Vega, G., Iturriaga, T. 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol.* 40: 225-242.

- San Blas, G., Nino-Veja, G., Barreto, L., Hebel-er-Barbosa, F., Bagagli, E., Olivero de Briceno, R., Mendes, R. P. 2005. Primers for clinical detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol.* 43: 4255-4257.
- San Blas, G., San Blas, F. 1977. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. *Mycopathologia.* 62: 77-86.
- San Blas, G., San Blas, F. 1985. Molecular aspects of fungal dimorphism. *Crit Rev Microbiol.* 11: 101-127
- San Blas, G., San Blas, F. 1997. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. *Mycopathologia.* 62: 77-86.
- Santangelo, R. T., Nouri-Sorkhabi, M. H., Sorrell, T. C., Cagney, M., Chen, S. C., Kuchel, P. W., Wright, L. C. 1999. Biochemical and functional characterisation of secreted phospholipase activities from *Cryptococcus neoformans* in their naturally occurring state. *J Med Microbiol.* 48: 731-40.
- Schaffner, A., Davis, C. E., Schaffner, T., Markert, M., Douglas, H., Braude, A. I. 1986. In vitro susceptibility of fungi to killing by neutrophil granulocytes discriminates between primary pathogenicity and opportunism. *J Clin Invest.* 78: 511-524.
- Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M. I., Liu, Y., Mangan, J. A., Monahan, I. M., Dolganov, G., Efron, B., Butcher, P. D., Nathan, C. and Schoolnik, G. K. 2003. Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *J Exp Med.* 198: 693-704.
- Scheurle, D., DeYoung, M. P., Binniger, D. M., Page, H., Jahanzeb, M., Narayanan, R. 2000. Cancer gene discovery using digital differential display. *Cancer Res.* 60: 4037-4043.

- Schneider, O., Zelck, U. E. 2001. Differential display analysis of hemocytes from schistosome-resistant and schistosome-susceptible intermediate hosts. *Parasitol Res.* 87: 489-491.
- Selitrennikoff, C.P., Nakata, M. 2003. New cell wall targets for antifungal drugs. *Current Opinion in Investigational Drugs.* 4: 200-205.
- Semighini, C. P., de Camargo, Z. P., Puccia, R., Goldman, M. H., Goldman, G. H. 2002. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by 5' nuclease assay. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 44: 383-386.
- Siderius, M., Rots, E., Mager, W. H. 1997. High-osmolarity signalling in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated in a carbon-source-dependent fashion. *Microbiology.* 143: 3241-3250.
- Sies H. 1997. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 82: 291-295.
- Silva Jr, J. M. C. 2000. Caracterização do cDNA *M51*, diferencialmente expresso na forma miceliana de *Paracoccidioides brasiliensis*. Universidade de Brasília. Instituto de Ciências Biológicas.
- Silva, S. P., Borges-Walmsley, M. I., Pereira, I. S., Soares, C. M., Walmsley, A. R., Felipe, M. S. S. 1999. 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.* 31: 1039-1050.
- Silva, S. P., Felipe, M. S. S., Pereira, M., Azevedo, M. O. Soares, C. M. A. 1994. Phase transition and stage-specific protein synthesis in the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Experimental Mycology.* 18: 294-299.
- Silverman, D. J., Santucci, L. A., Meyers, N., Sekeyova, Z. 1992. Penetration of host cells by *Rickettsia rickettsii* appears to be mediated by a phospholipase of rickettsial origin. *Infect Immun.* 60: 2733-2740.

- Spiczki, M., Takeo, K., Yamaguchi, M., Yoshida, S., Miklos, I. 1998. Environmentally controlled dimorphic cycle in a fission yeast. *Microbiology*. 144: 1319-1330.
- Smith, D. L., Tao, T. and Maguire, M. E. 1993. Membrane topology of a P-type ATPase. *J Biol Chem*. 268: 22469-22479.
- Smith, W.L. and Edlind, T.D. 2002. Histone deacetylase inhibitors enhance *Candida albicans* sensitivity to azoles and related antifungals: correlation with reduction in CDR and ERG upregulation. *Antimicrob Agents Chemother*.46: 3532-3539.
- Soares, C. M. A., Molinari-Madlum, E. E. W. I., Silva, S. P., Pereira, M., Felipe, M. S. S. 1995. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol*. 33: 505-507.
- Soares, R. B., Velho, T. A., De Moraes, L. M., Azevedo, M. O., Soares, C. M., Felipe, M. S. S. 2005. Hygromycin B-resistance phenotype acquired in *Paracoccidioides brasiliensis* via plasmid DNA integration. *Med Mycol*. 43: 719-723.
- Sohn, K., Urban, C., Brunner, H., Rupp, S. 2003. EFG1 is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays. *Mol Microbiol*. 47: 89-102.
- Soundararajan, S., Jedd, G., Li, X., Ramos-Pamplona, M., Chua, N. H., Naqvia, N. I. 2004. Woronin body function in *Magnaporthe grisea* is essential for efficient pathogenesis and for survival during nitrogen starvation stress. *Plant Cell*. 16: 1564–1574.
- Souto, J. T., Figueiredo, F., Furlanetto, A., Pfeffer, K., Rossi, M. A., Silva, J. S. 2000. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol*. 156: 1811-1820.
- Spencer, B., Hussey, E. C, Orsi, B. A., Scott, J. M. 1968. Mechanism of choline O-sulphate utilization in fungi. *Biochem J*. 106: 461-469.

- Splendore, A. 1912. Un'afezione micotica con localizzazione nella mucosa della bocca, osservata in Brasile, determinata da funghi appartenenti alla tribu degli Exoascei (*Zymonema brasiliensi*, n. sp.) in volume in onore del prof. Angelo Celli nel 25° anno di insegnamento, Roma, G. Bertero: 421-458.
- Steen, B. R., Lian T, Zuyderduyn, S., MacDonald, W. K., Marra, M., Jones, S. J., Kronstad, J. W: 2002. Temperature-regulated transcription in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genome Res.* 12: 1386-1400.
- Taborda, C. P., Juliano, M. A., Puccia, R., Franco, M., Travassos, L. R. 1998 . Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. *Infect Immun.* 66: 786-793.
- Taborda, C. P., Nakaie, C. R., Cilli, E. M., Rodrigues, E. G., Silva, L. S., Franco, M. F., Travassos, L. R. 2004. Synthesis and immunological activity of a branched peptide carrying the T-cell epitope of gp43, the major exocellular antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Scand J Immunol.* 59: 58-65.
- Talbot, N. J., Kershaw, M. J., Wakley, G. E., De Vries, O., Wessels, J., Hamer, J. E. 1996. MPG1 Encodes a Fungal Hydrophobin Involved in Surface Interactions during Infection-Related Development of *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell.* 8: 985-999.
- Tavares, A. H., Silva, S. S., Bernardes, V. V., Maranhão, A. Q., Kyaw, C. M., Poças-Fonseca, M., Silva-Pereira, I. 2005. Virulence insights from the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genetics and Molecular Researchs.* 4: 358-371.
- Telles, G. P.; Brígido M. M; Almeida, N. F.; Viana, C. J. M.; Anjos, D. A., Walter, M. E. M. T. 2005. A method for comparing three genomes. In: Brazilian Symposium on Bioinformatics - São Leopoldo. Lecture Notes on Bioinformatics/Lecture Notes on Computer Science.

- Theis, T., Stahl, U. 2004. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cell Mol Life Sci.* 61: 437-455.
- Tian, X., Shearer, G. Jr. 2001. Cloning and analysis of mold-specific genes in the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Gene.* 275: 107-114.
- Trinci, A. P., Collinge, A. J. 1974. Occlusion of the septal pores of damaged hyphae of *Neurospora crassa* by hexagonal crystals. *Protoplasma.* 80: 57-67.
- Tristano, A. G., Chollet, M. E., Willson, M., Perez, J., Troccoli, M. 2004. Central nervous system paracoccidioidomycosis: case report and review. *Invest Clin.* 45: 277-288.
- Tusher, V. G., Tibshirani, R. Chu, G. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 5116-5121.
- Van Wetter, M. A., Wosten, H. A., Sietsma, J. H., Wessels, J. G. 2000. Hydrophobin gene expression affects hyphal wall composition in *Schizophyllum commune*. *Fungal Genet Biol.* 31: 99-104.
- Vaz, C. A., Mackenzie, D. W., Hearn, V. M., Camargo, Z. P., Singer-Vermes, L. M., Burger, E., Calich, V. L. 1992. Specific recognition pattern of IgM and IgG antibodies produced in the course of experimental paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Immunol.* 88: 119-123.
- Velculescu, V. E, Zhang, L., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science.* 270: 484-487.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M. A., Bassett, D. E. Jr., Hieter, P., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. 1997. Characterization of the yeast transcriptome. *Cell.* 88: 243-251.

- Venâncio, E. J., Daher, B. S., Andrade, R. V., Soares, C. M., Pereira, I. S., Felipe, M. S. 2002. The *kex2* gene from the dimorphic and human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast*. 19: 1221-1231.
- Venâncio, E. J., Kyaw, C. M., Mello, C. V., Silva, S. P., Soares, C. M., Felipe, M. S., Silva-Pereira, I. 2002. Identification of differentially expressed transcripts in the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by differential display. *Med Mycol*. 40: 45-51.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W. *et al.* 2001. The sequence of the human genome. *Science*. 291: 1304-1351. Erratum in: *Science*. 292:1838.
- Vergara, M. L. and Martinez, R. 1998-99. The role of *Daypsus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 144: 131-133.
- Von, Mering. C., Krause, R., Snel, B., Cornell, M., Oliver, S. G., Fields, S., Bork, P. 2002. Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature*. 417: 399-403.
- Wan, J. S., Sharp, S. J., Poirier, G. M., Wagaman, P. C., Chambers, J., Pyati, J., Hom, Y. L., Galindo, J. E., Huvar, A., Peterson, P. A., Jackson, M. R., Erlander, M. G. 1996. Cloning differentially expressed mRNAs. *Nat Biotechnol*. 14: 1685-1691.
- Weckwerth, W. 2003. Metabolomics in systems biology. *Annu Rev Plant Biol*. 54: 669-689.
- Wessels, J. G. 1997. Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv Microb Physiol*. 38: 1-45.
- Wills, E. A., Redinbo, M. R., Perfect, J. R., Del Poeta, M. 2000. New potential targets for antifungal development. *Emerging Therapeutic Targets*. 4: 1-42.
- Winkler, H. H., Daugherty, R. M. 1989. Phospholipase A activity associated with the growth of *Rickettsia prowazekii* in L929 cells. *Infect Immun*. 57: 36-40.

- Whiteman, M., Halliwell, B. 1996. Protection against peroxynitrite-dependent tyrosine nitration and alpha 1-antiproteinase inactivation by ascorbic acid. A comparison with other biological antioxidants. *Free Radic Res.* 25: 275-283.
- Whitfield, M. L., Sherlock, G., Saldanha, A. J., Murray, J. I., Ball, C. A., Alexander, K. E., Matese, J. C., Perou, C. M., Hurt, M. M., Brown, P. O., Botstein, D. 2002. Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Molecular Biology of the Cell.* 13: 1977-2000.
- Whitney, A. R., Diehn, M., Popper, S. J., Alizadeh, A. A., Boldrick, J. C., Relman, D. A., Brown, P. O. 2003. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 1896-1901.
- Wysong, D. R., Christin, L., Sugar, A. M., Robbins, P. W., Diamond, R. D. 1998. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immun.* 66: 1953-1961.
- Yang, Y.L. 2003. Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect.* 36: 223-228.
- Zakrzewska, A., Boorsma, A., Brul, S., Hellingwerf, K. J., Klis, F. M. 2005. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to the plasma membrane-perturbing compound chitosan. *Eukaryot Cell.* 4: 703-715.
- Zhao, R., Daniels, K. J., Lockhart, S. R., Yeater, K. M., Hoyer, L. L., Soll, D., R. 2005. Unique aspects of gene expression during *Candida albicans* mating and possible G (1) dependency. *Eukaryot Cell.* 4: 1175-1190.
- Zhu, H., Cong, J. P., Mamtora, G., Gingeras, T., Shenk, T. 1998. Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotid arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 14470-14475.