

Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina

Caracterização e análise da expressão de genes (*sod3* e *ccp*)  
envolvidos no estresse oxidativo em *Paracoccidioides brasiliensis*

Carine Ribeiro Pessoa

Orientadora: Dra. Maria Sueli Soares Felipe

Julho – 2006  
Brasília – DF

Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina

Caracterização e análise da expressão de genes (*sod3* e *ccp*)  
envolvidos no estresse oxidativo em *Paracoccidioides brasiliensis*

Carine Ribeiro Pessoa

Orientadora: Dra. Maria Sueli Soares Felipe

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Patologia Molecular (Genética Molecular).

Julho – 2006  
Brasília – DF

## **Banca examinadora**

Profª. Dra. Célia Maria de Almeida Soares  
Laboratório de Biologia Molecular, ICB, UFG

Profª. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca  
Departamento de Biologia Celular, IB, UnB

Profª. Dra. Maria Sueli Soares Felipe  
Departamento de Biologia Celular, IB, UnB

Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres (Suplente)  
Departamento de Biologia Celular, IB, UnB

Trabalho realizado no laboratório de  
Biologia Molecular do Instituto de  
Ciências Biológicas da Universidade  
de Brasília.

**Dedico este trabalho aos meus pais  
Edilson e Francisca (Nenen).**

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Profª. Sueli, que me deu a oportunidade de concluir o mestrado, pois ao assumir a efetiva orientação, propôs, em primeiro lugar, um projeto de mestrado executável. Sua experiência, competência e orientação foram essenciais para este trabalho, em todos os aspectos, desde a proposta inicial até a conclusão da escrita. Muito obrigada, por tudo!

Aos profs. Fernando Araripe, Ildinete Silva e Lídia Pepe, pela efetiva contribuição na minha formação. Ainda na graduação, vocês foram os principais inspiradores para a busca da área de Biologia Molecular e depois, no convívio do laboratório sempre estiveram disponíveis para contribuir, esclarecer dúvidas e apoiar nos momentos difíceis...

À profª. Élide Campos, por sua contribuição nessa reta final que foi fundamental para a conclusão da escrita. Obrigada por estar sempre presente de maneira tranqüila e eficiente, seu apoio foi imprescindível.

À Alessandra Dantas, pelo “curso rápido e avançado” sobre estresse oxidativo, que encurtou o caminho a ser percorrido, sem você eu não teria conseguido concluir essa etapa, muito obrigada!

Às secretárias Ana Tibert (Biologia Celular), Carolina Okawachi, Hérika Menezes (Patologia Molecular) e funcionárias D. Fátima e D. Ivanilde pela disposição de ajudar em tudo que fosse preciso.

A todos os companheiros da BioMol, por tornarem o nosso ambiente de trabalho tão menos estressante, pelas discussões enriquecedoras, comentários, disposição de apoiar uns aos outros. Eu não poderia cometer a indelicadeza de esquecer de citar alguém por isso agradeço a todos, e especialmente aos colegas do lab. 4 que me acolheram com carinho no momento mais delicado deste curso, a todos vocês muito obrigada.

## **Agradecimentos**

Ao meu marido, Kennedy, pela paciência de esperar o término deste trabalho e por seu imenso amor; de agora em diante, eu você e a Ana estaremos juntos, pode ser em qualquer lugar, porém juntos...

À todos de casa, Nenen, Edilson, Aline, Carol, Paulo, Régia que, entre outras coisas, cuidaram da minha filha durante a minha ausência, sem vocês não haveria tranquilidade para ficar longe tanto tempo.

Ao meu irmão, cunhado e amigo Makmiller, por todos os momentos de companheirismo, convivência e descontração...

Aos amigos queridíssimos que me acolheram na fase “sem-teto”: Mariana Quezado, Anderson Couto e Makmiller Pedroso; Magda Linhares, Josemar Dantas e Maria Luíza, vocês tornaram esse período tão difícil muito mais agradável, obrigada pelo apoio inestimável.

Aos amigos, de todas as horas, Mariana Quezado e André Naves, que têm estado comigo em todos os momentos decisivos da minha vida, obrigada pelo carinho, companheirismo e amizade.

Aos amigos, Larissa Fernandes e Marciano Rubini, pelo apoio contínuo, sugestões, correções e principalmente a amizade...

À Viviane Reis e Maria José Carvalho, por sempre estarem dispostas a contribuir, com o que fosse preciso;

À todos os amigos de Fortaleza, que mesmo distantes se fizeram presentes, torcendo e apoiando, sempre.

## ÍNDICE

Índice de figuras .....	vii
Índice de tabelas .....	viii
Lista de siglas e abreviaturas .....	ix
Resumo .....	xi
Abstract .....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1. O fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	1
1.2. A Paracoccidioidomicose .....	4
1.3. O projeto “Genoma funcional e diferencial do fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ” .....	7
1.4. Estresse oxidativo nos sistemas biológicos .....	11
1.4.1. Espécies reativas de oxigênio (EROS) .....	11
1.4.2. Resposta ao estresse oxidativo .....	14
1.4.2.1. Defesas antioxidantes .....	14
— As enzimas superóxido dismutases (SOD) .....	15
— A enzima citocromo c peroxidase (CCP).....	19
1.4.3. Respostas adaptativas ao estresse.....	21
2. Justificativa.....	25
3. Objetivos.....	26
3.1. Objetivo geral .....	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
4. Materiais e Métodos.....	27
4.1. Materiais .....	27
4.1.1. Meios de Cultivo .....	27
4.1.2. Antibióticos e fator de crescimento de <i>P. brasiliensis</i> .....	28
4.1.3. Southern blot .....	29
4.1.4. Northern blot.....	31
4.1.5. Preparo de extrato protéico e medida da atividade enzimática.....	32

4.2. Métodos .....	34
4.2.1. Transição de micélio para levedura.....	34
4.2.2. Choque térmico .....	34
4.2.3. Extração de RNA .....	34
4.2.4. Extração de DNA.....	35
4.2.5. Extração de DNA plasmidial em pequena escala .....	35
4.2.6. Seqüenciamento automático .....	36
4.2.7. Quantificação de ácidos nucleicos .....	36
4.2.8. Preparo da sonda .....	36
4.2.9. Southern blot.....	37
4.2.10. Northern blot.....	39
4.2.11. Preparo do extrato protéico.....	41
4.2.12. Quantificação de proteínas.....	41
4.2.13. Medida das atividades enzimáticas .....	41
4.2.14. Análise estatística dos dados.....	42
5. Resultados e Discussão .....	43
5.1 Caracterização molecular dos cDNA que codificam para as enzimas PbSOD3 e PbCCP .....	47
5.1.1. Superóxido dismutase GPI-ancorada .....	47
5.1.2. Citoromo c peroxidase.....	51
5.2. Determinação do número de cópias dos genes que codificam para PbSOD3 e PbCCP ...	54
5.3. Análise da expressão gênica da PbSOD3 durante a transição dimórfica e o choque térmico, por northern blot.....	56
5.4. Análise da expressão gênica da PbCCP durante a transição dimórfica e o choque térmico, por northern blot.....	61
5.5. Análise da atividade enzimática da PbCCP durante o choque térmico.....	64
6. Conclusões .....	67
7. Perspectivas .....	69
8. Referências bibliográficas .....	70

## Índice de figuras

Figura 1. Principais vias existentes no interior das células fagocitárias que geram espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e cloro .....	12
Figura 2. Seqüência de nucleotídeos e de resíduos de aminoácidos deduzidos da PbSOD3 ...	48
Figura 3. Alinhamento entre as seqüências Sod4 e Sod5 de <i>C. albicans</i> e a provável superóxido dismutase GPI-ancorada de <i>P. brasiliensis</i> (PbSOD3).....	50
Figura 4. Seqüência parcial de nucleotídeos e de resíduos de aminoácidos deduzidos da PbCCP .....	52
Figura 5. Alinhamento das seqüências de aminoácidos da CCP de <i>P. brasiliensis</i> e dos fungos <i>Ustilago maydis</i> , <i>C. neoformans</i> e <i>A. fumigatus</i> .....	54
Figura 6. Análise de Southern blot para determinação do número de cópias dos genes PbSOD3 e PbCCP de <i>P. brasiliensis</i> .....	55
Figura 7. Análise da expressão da PbSOD3 por northern blot durante a transição de micélio para levedura .....	57
Figura 8. Análise da expressão da PbSOD3 por northern blot durante o choque térmico.....	58
Figura 9. Análise da expressão da PbCCP por northern blot durante a transição de micélio para levedura .....	62
Figura 10. Análise da expressão da PbCCP por northern blot durante o choque térmico .....	63
Figura 11. Atividade específica (U/mg de proteína) da PbCCP .....	64

## Índice de tabelas

Tabela 1. Categorização funcional de PbAEST's.....	8
Tabela 2. Genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo identificados no transcriptoma do <i>P. brasiliensis</i> . .....	43
Tabela 3. Identidade e similaridade entre as seqüências PbSOD3 e CuZnSODs intracelulares dos fungos <i>N. crassa</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. albicans</i> e <i>P. brasiliensis</i> .....	51
Tabela 4. Identidade e similaridade entre as seqüências de CCP de <i>P. brasiliensis</i> e outros fungos.....	54

## Lista de siglas e abreviaturas

BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool”
BSA	albumina bovina sérica
cAMP	monofosfato de adenosina cíclico
CCP	citocromo c peroxidase
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
cm	centímetro
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeo 5’ trifosfato
EC-SOD	superóxido dismutase extracelular
EROS	espécies reativas de oxigênio
EST	“expressed sequence tag”
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FMN	flavina mononucleotídeo
GFP	“Green Fluorescent Protein”
GPI	glicosilfosfatidilinositol
GPx	glutaciona peroxidase
GSH	glutaciona
HSP	“heat shock protein”
IFN- $\gamma$	interferon gama
kb	quilobase
kDa	quiloDalton
MAPK	“Mitogen-Activated Protein Kinase”
Mb	megabase
mL	mililitro
mM	milimolar
MPO	mieloperoxidase
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
p/v	peso/volume

PAPS	3'-fosfoadenosil 5'-fosfosulfato
pb	pares de base
PCR	reação da polimerase em cadeia
pH	potencial de hidrogênio
PKA	proteína quinase A
PMN	leucócitos polimorfonucleados
RNA	ácido ribonucléico
rRNA	ácido ribonucléico ribossomal
RNAi	ácido ribonucléico de interferência
RNase	ribonuclease
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SOD	superóxido dismutase
°C	graus Celsius
μL	microlitro
μM	micromolar

## RESUMO

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é dimórfico e patogênico ao homem. Ele é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), a micose sistêmica de maior incidência da América Latina. O estabelecimento da infecção é dependente da transição de micélio para levedura e este processo *in vitro* é reversível e regulado pela mudança de temperatura de 22 °C para 36 °C. O projeto “Genoma funcional e diferencial do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*” identificou 6.022 PbAEST, que correspondem a genes expressos no fungo, representando aproximadamente 80% do genoma do fungo. Na interação patógeno-hospedeiro, a resposta eficiente do patógeno contra o ataque oxidativo imposto pelas células fagocitárias do hospedeiro facilita a sua sobrevivência no hospedeiro. Os genes potencialmente envolvidos na resposta ao estresse oxidativo em *P. brasiliensis*, identificados no projeto transcriptoma, foram categorizados em 4 classes: enzimas antioxidantes (12 PbAESTs), biossíntese e metabolismo da glutatona e regeneração de NADPH (11 PbAESTs), homeostase de íons metálicos (3 PbAEST) e fatores transcricionais (7 PbAESTs). Entre as seqüências anotadas no transcriptoma, foram estudadas neste trabalho aquelas que codificam para a CuZn superóxido dismutase GPI-ancorada (PbSOD3) e a citocromo c peroxidase (PbCCP). A superóxido dismutase retira do ambiente radical superóxido produzindo peróxido de hidrogênio e por sua vez, a citocromo c peroxidase, uma das peroxidases existentes nas células, reduz o peróxido de hidrogênio a água. A seqüência de cDNA que codifica para a enzima CuZnSOD GPI-ancorada (PbSOD3) de *P. brasiliensis* foi completamente seqüenciada. Esta enzima possui massa molecular deduzida de 24,3 kDa e a assinatura característica da família CuZnSOD e da região de ancoragem a GPI na região carboxi-terminal. A análise comparativa das seqüências protéicas PbSOD3 e Sod5 de *C. albicans* indicou cerca de 40% de similaridade em toda a extensão da proteína, sendo mais conservadas as regiões da assinatura do sítio catalítico e de ancoragem a GPI. A análise no programa PSORT II indicou que a PbSOD3 deve estar localizada na parede celular (34,8% de probabilidade) ou com a mesma probabilidade, na membrana celular. A seqüência de cDNA que codifica para a citocromo c peroxidase (PbCCP) está parcial e a seqüência da proteína deduzida mostra a presença do sítio ativo da peroxidase, sendo bastante conservada quando comparada com CCPs de outros fungos. A análise de Southern blot indicou que os genes que codificam para as enzimas PbSOD3 e CCP estão presentes no genoma do fungo em cópia única. A análise da

expressão dos genes que codificam para a PbSOD3 e PbCCP durante a transição dimórfica *in vitro*, mostrou que ocorreu uma oscilação; entretanto, não ocorreu uma alteração do padrão de expressão significativamente diferente entre as formas de micélio e levedura. Também não foi observada variação significativa da expressão para ambos os genes, em nível transcricional, durante o choque térmico a 42 °C. Os ensaios de medida de atividade enzimática extracelular para a enzima SOD de *P. brasiliensis*, utilizando o meio de cultura das células de levedura, não detectaram atividade desta enzima, sugerindo que a mesma deve estar associada à parede celular e/ou membrana celular. A atividade enzimática da CCP de *P. brasiliensis* durante o choque térmico a 42 °C diminuiu em função do tempo de incubação das células de levedura, entretanto os valores ainda eram altos no fim do choque térmico, indicando que provavelmente este patógeno é capaz de responder ao estresse oxidativo durante esta condição de drástica alteração fisiológica. Os dados sugerem fortemente que o *P. brasiliensis* está apto, desde a forma de micélio, a responder contra as injúrias provocadas pelo estresse oxidativo, uma vez que este patógeno apresenta níveis similares de expressão dos genes *sod3* e *ccp* nas duas formas, micélio e levedura. Experimentos de RNAi ou nocaute dos genes *sod3* e *ccp* de *P. brasiliensis* devem ser realizados para efetivamente demonstrar a função destas enzimas na proteção contra o estresse oxidativo.

## ABSTRACT

*Paracoccidioides brasiliensis* is a dimorphic and human pathogenic fungus. It is the causative agent of paracoccidioidomycoses (PCM), an endemic disease widespread in Latin America. The establishment of infection depends on the transition from mycelium to yeast form and this process *in vitro* is reversible and dependent on temperature shifts from 22 °C to 36 °C. The transcriptome project identified 6.022 PbAEST that corresponds to expressed genes in fungus, representing approximately 80% of fungus genome. This data has allowed the identification of genes related in different biological processes of the fungus such as dimorphism, virulence and pathogenicity. In pathogen-host interaction, an efficient pathogen's response against oxidative attack imposed from host phagocytic cells facilitates the pathogen survival in host. The genes potentially related in oxidative stress response in *P. brasiliensis* identified in transcriptoma project were categorized in 4 groups: antioxidant enzymes (12 PbAESTs); biosynthesis and metabolism of glutathione and NADPH regeneration (11 PbAESTs); ions homeostasis (3 PbAESTs) and transcription factors (7 PbAESTs). Among the annotated sequences in transcriptome, that ones coding for enzymes superoxide dismutase GPI-anchored (PbSOD3) and cytochrome c peroxidase (PbCCP) were analyzed in this study. The enzyme superoxide dismutase removes superoxide radical producing hydrogen peroxide and cytochrome c peroxidase, one of peroxidases existing in cells, reduces hydrogen peroxide to water. The cDNA sequence coding for CuZnSOD GPI-anchored enzyme from *P. brasiliensis* was completely sequenced. The deduced amino acid sequence of PbSOD3 has the molecular mass predicted of 24,3 kDa and pI of 6,05; furthermore, it has the protein signature of CuZnSOD family and a region for GPI anchoring in carboxyl-terminus. The comparative analysis of protein sequences of PbSOD3 and Sod5 of *C. albicans* indicated approximately 40% of similarity for the entire protein, where the most conserved regions are catalytic site of enzyme and GPI anchoring. The PSORTII program analysis revealed that PbSOD3 may be located in cell wall (34,8% of probability) or membrane plasmatic with the same probability. The cDNA sequence coding for cytochrome c peroxidase is parcial and the protein deduced sequence has the active site of peroxidases and this region is very conserved when compared with CCPs of other fungi. The Southern blot analysis revealed that the genes coding for enzymes PbSOD3 and PbCCP are present as single copies in the fungus genome. The expression analysis of the same genes demonstrated an oscillation

during dimorphic transition *in vitro*, however, do not occur any significantly difference in the gene expression pattern between mycelium and yeast forms. Also, it has not shown any significant difference in gene expression pattern during heat shock at 42 °C, at transcriptional level, for both genes. The extracellular enzymatic activity assay, using yeast culture medium (or supernatant), was done to verify *P. brasiliensis* SOD activity with no activity detected. This result suggests that this enzyme may be associated to cell wall and/or plasmatic membrane. The enzymatic activity of *P. brasiliensis* CCP during heat shock at 42 °C decreases in function of incubation time of yeast cells, but the values remained high at the end of heat shock, indicating that probably this pathogen is able to respond to oxidative stress during this drastic physiological change. These data strongly suggest that *P. brasiliensis* is capable, since mycelium form, to counteract injuries from oxidative stress, because this pathogen presents similar levels of gene expression for *sod3* and *ccp* in mycelium and yeast forms. Experiments *in vitro* and *in vivo* through gene silencing (RNAi) or nocaute may be designed utilizing *P. brasiliensis* *sod3* e *ccp* genes to efficiently determine if these enzymes are important to protect against oxidative stress.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. O fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* foi descrito por Adolpho Lutz em 1908, é um fungo dimórfico e patogênico ao homem. Desde a primeira descrição, a espécie *P. brasiliensis* vem sendo discutida. Em 1912, Alfonso Splendore estabeleceu as condições de cultivo *in vitro* para o fungo e o classificou como *Zymonema brasiliensis*. Em 1930, Floriano Paulo de Almeida propôs a mudança de nome do gênero para *Paracoccidioides* e desde então vem sendo considerado como uma espécie única. O fungo *P. brasiliensis* pertence ao filo Ascomycota, família Onygenaceae, ordem Onygenales e relaciona-se proximamente com outros fungos patogênicos como *Blastomyces dermatitidis*, *Emmonsia parva* e *Histoplasma capsulatum* (Bialek *et al.*, 2000; San-Blas *et al.*, 2005).

O fungo dimórfico *P. brasiliensis* é um patógeno humano, apresenta-se como micélio, com células uninucleadas que formam hifas septadas e ramificadas a temperatura ambiente e leveduras multinucleadas a 36 °C, temperatura do hospedeiro. A forma leveduriforme produz uma estrutura característica denominada roda de leme, na qual uma célula-mãe aparece circundada por múltiplos brotamentos (Furtado *et al.*, 1967). Essa estrutura é usada no diagnóstico diferencial deste patógeno. A transição de micélio para levedura *in vitro* é reversível e desencadeada pela mudança de temperatura de 22 °C para 36 °C, o que faz de *P. brasiliensis* um modelo para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos no dimorfismo e na expressão gênica diferencial (Silva *et al.*, 1994). Assume-se que o estabelecimento da infecção humana é dependente da transição de micélio para levedura o que pode refletir a necessidade de mudanças adaptativas para assegurar a sobrevivência do patógeno no hospedeiro humano (Franco, 1987). Observa-se também que linhagens que são incapazes de fazer a transição de micélio para levedura são avirulentas (San-Blas & Niño-Vega, 2001).

Um aspecto importante da transição dimórfica é a diferença na composição da parede celular entre as formas de micélio e levedura. Em *P. brasiliensis*, a forma leveduriforme possui maior quantidade de quitina (37 a 48%) que a forma miceliana (7 a 18%) (Kanetsuna *et al.*, 1969). Outro polissacarídeo que difere nas duas fases é a glucana. O micélio é composto preferencialmente por  $\beta$ -glucana enquanto na levedura, a  $\alpha$ -glucana é o principal polímero de glicose presente (95%), indicando um possível papel desse

polissacarídeo na virulência do fungo (Kanetsuna & Carbonell, 1970). Em contrapartida, a parede celular da forma miceliana é mais rica em proteínas (24 a 41%), enquanto a parede das leveduras possui apenas 7 a 14% de constituintes protéicos (Kanetsuna *et al.*, 1969). Os genes relacionados com a biossíntese de componentes da parede celular de *P. brasiliensis* tais como  $\alpha$ -1,3-glucana sintase (*ags*), quitina sintase (*chs*), manosiltransferases, glucosamina-6-fosfato acetil transferase (*gna*) são considerados potenciais fatores de virulência bem como potenciais alvos de drogas antifúngicas (Felipe *et al.*, 2005; Tavares *et al.*, 2005).

Ainda hoje pouco se conhece do habitat natural e do ciclo biológico do *P. brasiliensis*. Assume-se que a forma miceliana saprobiótica encontra-se no solo e produz propágulos assexuais que podem infectar o homem após sua inalação (San-Blas *et al.*, 2002). Alguns estudos mostram o isolamento deste fungo a partir de tatus silvestres da espécie *Dasypus novemcinctus* numa área onde a PCM é endêmica (Bagagli *et al.*, 1998; Vergara, *et al.*, 1998; Silva-Vergara *et al.*, 2000). Inicialmente postulou-se que o tatu fosse um reservatório natural do fungo, visto que não havia evidências clínicas da doença no animal infectado (Bagagli *et al.*, 1998). Posteriormente, a formação de granuloma foi observada em diversos órgãos do tatu, tais como pulmão, baço e fígado, sugerindo que esses animais sejam também um possível hospedeiro de *P. brasiliensis* (Restrepo *et al.*, 2001). O fato da distribuição geográfica do *D. novemcinctus* se sobrepor em grande parte às áreas endêmicas da paracoccidiodomicose (PCM), e do hábito do animal estar intimamente ligado ao solo, pode favorecer a delimitação da área do possível reservatório natural do *P. brasiliensis* e conseqüentemente aquela que o paciente, na maioria trabalhadores rurais, entra em contato com o fungo (Marques, 2003). Recentemente foi relatado um caso de infecção de um cão adulto doméstico no qual foi verificada a formação de granuloma epitelióide, lesão característica da manifestação clínica da PCM (Ricci *et al.*, 2004). Diferentes autores já buscaram e/ou relataram o isolamento do fungo *P. brasiliensis* em outras espécies de tatus, primatas, felinos, morcegos, pingüins. Entretanto, tais estudos não trazem resultados conclusivos que elucidem esses aspectos da ecoepidemiologia do fungo.

É consenso entre os autores a importância do solo na ecologia do *P. brasiliensis*, entretanto, há uma dificuldade recorrente entre os mesmos no isolamento do fungo a partir do solo. Ono e colaboradores (2002) investigaram o efeito de resíduos químicos comumente encontrados nas plantações sobre o crescimento de *P. brasiliensis* e mostraram

que alguns desses resíduos impediram o crescimento do fungo em todas as diluições e meios de cultura utilizados no estudo. Novas técnicas de PCR estão sendo testadas para tornar o isolamento do fungo a partir do solo mais eficiente.

O ascomiceto *P. brasiliensis* nunca teve seu ciclo sexual descrito, dificultando os estudos em genética e a elucidação dos mecanismos que contribuem para o dimorfismo, patogenicidade e virulência. Entretanto, fatores transcricionais relacionados ao ciclo sexual de ascomicetos e transcritos envolvidos em recombinação meiótica foram descritos no transcriptoma do *P. brasiliensis*, fornecendo forte evidência da ocorrência de ciclo sexual neste fungo (Felipe *et al.*, 2003; Felipe *et al.*, 2005). Apesar dos avanços, a composição genética, o tamanho do genoma e a organização cromossômica são pouco conhecidos. Estima-se que o fungo possua de 4 a 5 cromossomos, com um tamanho do genoma de cerca de 30 Mb, e que possua entre 7.500 e 9.000 genes (Cano, M. *et al.*, 1998; Montoya *et al.*, 1999; Feitosa *et al.*, 2003; Reinoso *et al.*, 2005).

Dentro da espécie foram descritos diversos isolados os quais variam o padrão genético, a distribuição geográfica, a patogenicidade e a virulência. A variabilidade genética dentro da espécie *P. brasiliensis* vem sendo analisada por ferramentas moleculares como RAPD “Random Amplified Polymorphic DNA”, RFLP “Restriction Fragment Length Polymorphism” (Soares *et al.*, 1995; Niño-Vega *et al.*, 2000), e cariotipagem por eletroforese (Montoya *et al.*, 1997; Montoya *et al.*, 1999). Matute e colaboradores (2006) propuseram, com base em estudos filogenéticos de 65 isolados de *P. brasiliensis*, a existência de três espécies filogeneticamente diferentes decorrentes de dois eventos independentes de especiação, correlacionados ao padrão de distribuição atual dessas potenciais espécies. Nesse estudo, os pesquisadores amplificaram 8 (oito) regiões de 5 (cinco) loci genômicos e analisaram pela ferramenta de máxima parcimônia.

O isolado Pb01 foi caracterizado pela análise de RAPD, e evidenciou-se que este isolado possui perfis genotípicos diferentes dos demais isolados analisados e que ele está localizado em grupo excludente, juntamente com o isolado Pb7455, pela análise de UPGMA (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”) (Soares *et al.* 1995 e Molinari-Madlum *et al.*, 1999). Um estudo realizado com 21 isolados de *P. brasiliensis* de diversas regiões da América do Sul, pela técnica de tipagem por seqüenciamento de multi locus (MSLT), mostrou que o isolado Pb01 pode pertencer a um novo táxon ou até mesmo a uma nova espécie pelas suas diferenças genotípicas e pelos padrões de filogramas obtidos nas análises de máxima parcimônia pelo PAUP 4.0. Todas as árvores geradas tiveram um

mesmo padrão, nas quais o isolado Pb01 encontrava-se em um ramo distinto dos demais isolados (Carrero *et al.*, em publicação).

Recentemente, foi realizado em nosso laboratório um estudo com mais 50 isolados de *P. brasiliensis* oriundos da região de Mato Grosso pela análise de MLST. Mostrou-se que 17 isolados apresentaram um padrão de agrupamento similar ao Pb01, estas análises encontram-se em andamento (Teixeira, M., comunicação pessoal) e certamente contribuirão, em muito, para a definição de possíveis novas espécies deste patógeno.

## 1.2. A Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistêmica de maior prevalência da América Latina (Franco, 1987; McEwen *et al.*, 1995; Restrepo *et al.*, 2001), estando geograficamente confinada a essa região. A PCM ocorre em áreas que se estendem do México à Argentina, onde predominam temperaturas que variam de 17 a 24 °C, índices pluviométricos de 900 a 1.800 mm/ano, florestas abundantes, inverno curto e verão chuvoso (Restrepo, 1985). Os países de maior incidência da PCM são Brasil (80% dos casos), Venezuela e Colômbia (Restrepo, 1985). Estima-se que 10 milhões de pessoas estejam infectadas e cerca de 2% desenvolverão a doença (Restrepo *et al.*, 2001). No Brasil, a PCM é a micose sistêmica de maior incidência, com taxa de mortalidade de aproximadamente 200 mortes por ano, com os estados das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste apresentando as maiores taxas de mortalidade (Coutinho *et al.*, 2002).

A PCM é predominantemente detectada em adultos do sexo masculino, apresentando uma taxa global de 13 homens para cada mulher doente (Brummer *et al.*, 1993) e em algumas áreas endêmicas essa taxa pode chegar a 78:1 (Restrepo *et al.*, 1984). Indivíduos de ambos os sexos têm o mesmo contato com o fungo, portanto essa grande incidência em indivíduos do sexo masculino não está relacionada com o grau de exposição ao patógeno. Além disso, indivíduos que ainda não atingiram a puberdade desenvolvem a doença independentemente do sexo. Essas observações vem sendo relacionadas a componentes hormonais do hospedeiro, os quais podem estar atuando na patogenia do fungo. Nesse contexto, Restrepo e colaboradores (1984) mostraram que o hormônio feminino  $\beta$ -estradiol inibe a transição *in vitro* de *P. brasiliensis* da forma de micélio para levedura, outros estudos corroboraram esses resultados e adicionalmente mostraram que a

transição de conídio para levedura também é impedida por esse hormônio, evidenciando o seu papel protetor (Loose *et al.* 1983, Stover *et al.*, 1986, Salazar *et al.*, 1988).

Assume-se que o patógeno na forma miceliana presente no solo, produz conídios ou propágulos que são dispersos pelo ar. Ao serem inalados, os conídios atingem os pulmões, onde sofrem a transição para a forma de levedura, fundamental para o estabelecimento da infecção (San-Blas *et al.*, 2002). Posteriormente, a infecção poderia ser disseminada para os demais tecidos do hospedeiro, tornar-se latente, ou ser erradicada, dependendo da resposta imunológica do hospedeiro e da virulência do fungo (Franco *et al.*, 1994; San-Blas *et al.*, 2002). A infecção pode dar-se ainda por trauma na mucosa oral, anal ou cutânea (Restrepo, 1978).

A maioria dos indivíduos infectados por *P. brasiliensis* desenvolve apenas infecção assintomática, definida como paracoccidiodomicose-infecção, a qual acomete principalmente indivíduos sadios que vivem em áreas endêmicas. Em outros indivíduos, a infecção pode progredir originando a doença com manifestações clínicas diversas, sendo caracterizada principalmente por granulomas crônicos com alta frequência de lesões pulmonares e mucocutâneas (Franco, 1987; Franco *et al.*, 1993). Desse modo, a PCM pode dar origem a duas formas que se diferenciam quanto a características clínicas, imunológicas e histopatológicas: a forma aguda (tipo juvenil) ou a forma crônica (tipo adulto). A PCM aguda está associada a taxas de mortalidade significativas, sendo geralmente de caráter bastante severo, e acometendo, principalmente, jovens de ambos os sexos. Essa forma da doença desenvolve-se rapidamente (semanas a meses), atinge primariamente os pulmões, e progride por disseminação linfática e sangüínea, comprometendo principalmente o sistema reticuloendotelial (baço, fígado, linfonodos e medula óssea). A forma aguda responde por 3 a 5% dos casos. A forma crônica da doença é mais comum, cerca de 90% de todos os casos, e é caracteristicamente de progressão lenta (meses a anos). Nesse tipo da doença, as lesões são restritas a alguns órgãos, sendo na maioria dos casos unifocal (lesão apenas no pulmão) e em outros multifocal, com as lesões extrapulmonares atingindo as mucosas oral e nasal, pele, linfonodos e glândulas adrenais. A forma crônica pode acarretar seqüelas pulmonares e subcutâneas e, em casos mais graves, ou na ausência de tratamento adequado, pode vir a causar a morte do indivíduo doente. Os pacientes que desenvolvem esse tipo de manifestação clínica da doença são geralmente adultos do sexo masculino (Franco, 1987; Brummer *et al.*, 1993)

A resposta imune celular e a formação de lesões granulomatosas fornecem uma resposta protetora máxima do hospedeiro (migração, diferenciação e ativação de macrófagos) contra patógenos intracelulares (Rumbley & Phillips, 1999). Esse aspecto é particularmente importante para *P. brasiliensis*, uma vez que esse fungo pode se apresentar como um patógeno intracelular facultativo, capaz de sobreviver e se replicar no interior de células epiteliais e de macrófagos murinos e humanos não ativados (Brummer *et al.*, 1989; Moscardi-Bacchi *et al.*, 1994).

A PCM é caracterizada por ser uma doença de padrão granulomatoso. O granuloma é a lesão fundamental que ocorre na PCM, apresentando-se como componente essencial na defesa anti-*P. brasiliensis*. Essa lesão resulta de uma reação de hipersensibilidade tardia (DTH) contra antígenos do agente infeccioso, ocorrendo também em outras doenças infecciosas, como tuberculose, hanseníase e histoplasmose. O desenvolvimento do granuloma permite a contenção do patógeno, impedindo sua disseminação pelo organismo (Romani, 1997). O macrófago é a principal célula integrante do granuloma, apresentando atividades microbidas e de apresentador de antígeno, além de, juntamente com linfócitos T, produzir citocinas. Plasmócitos, eosinófilos e fibroblastos também estão presentes no granuloma (de Brito & Franco, 1994). A atividade de linfócitos T e a resposta granulomatosa são características das formas localizadas da infecção, enquanto que nas formas disseminadas não se observa formação de granulomas epitelióides (San-Blas & Niño-Vega, 2001; Murphy, 1998).

A resistência do hospedeiro à infecção por *P. brasiliensis* está relacionada à formação de um granuloma epitelióide compacto e à capacidade de desenvolver uma resposta imunológica celular efetiva (Franco, 1987; Franco *et al.*, 1993). Em modelos murinos, a resistência também tem sido associada ao papel do interferon gama (IFN- $\gamma$ ) (Cano, L. *et al.*, 1998), importante na ativação dos macrófagos para a produção de óxido nítrico (NO), que atua como agente microbicida (Bocca *et al.*, 1998). O IFN- $\gamma$  também estimula macrófagos infectados por *P. brasiliensis* a secretar fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), necessário para a persistência do granuloma. (Souto *et al.*, 2000). Em camundongos resistentes a paracoccidioidomicose, verificou-se uma infecção caracterizada pela ativação de macrófagos e neutrófilos, sendo evidenciada principalmente pelo aumento da produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e manutenção da produção do ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Além disso, esses animais apresentaram no início da infecção uma alta e constante produção de IFN- $\gamma$  e pequena produção de citocinas do tipo 2 (IL-4, IL-5 e IL-

10). Já em camundongos suscetíveis, verificou-se nível baixo e transitório de IFN- $\gamma$  e produção relativamente alta de IL-5 e IL-10. Estes resultados sugerem que a produção alta e precoce de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  seguida da manutenção da produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  desempenha papel dominante nos mecanismos de resistência a infecção por *P. brasiliensis*. (Calich & Kashino, 1998; Kashino *et al.*, 2000).

Recentemente, Carmo e colaboradores (2006) demonstraram que a atividade microbicida por monócitos humanos pode ter a participação efetiva do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uma vez que a atividade fungicida dessas células diminuiu drasticamente com a presença da enzima catalase no sistema contendo monócitos ativados por TNF- $\alpha$  e desafiados por *P. brasiliensis*. Adicionalmente, verificou-se que a presença dessa enzima não produziu nenhum efeito tóxico aos monócitos nem ao fungo e que a produção desse metabólito estava diminuída na presença da catalase. Esses dados se opõem aos encontrados em modelos murinos, nos quais demonstrou-se que os macrófagos exercem atividade microbicida por mecanismos independentes da via oxidativa (Brummer *et al.*, 1988)

### **1.3. O projeto “Genoma funcional e diferencial do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*”**

O projeto da rede Centro-Oeste do genoma brasileiro intitulado “Genoma funcional e diferencial do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*” objetivou o seqüenciamento em larga escala de genes expressos nas formas de micélio e levedura *in vitro* (Felipe *et al.*, 2003, Felipe *et al.*, 2005). Com a análise dos dados, espera-se que genes potencialmente envolvidos no dimorfismo, virulência e patogenicidade possam ser identificados para em um segundo momento serem utilizados em estudos que permitam a elucidação dos mecanismos envolvidos na infecção do hospedeiro e estabelecimento da doença.

No projeto, foram comparados os conjuntos de genes expressos no micélio e na levedura. As EST's (“expressed sequence tag”) foram geradas a partir de bibliotecas não normalizadas de cDNA de micélio e levedura. Os insertos de cDNA variaram de 0,5 a 2,5 kb, e foi feito o seqüenciamento a partir da extremidade 5' de 25.598 clones randomicamente selecionados de ambas as bibliotecas. Após a remoção de seqüências derivadas de contaminação com DNA bacteriano e rRNA, obteve-se 19.718 EST's de alta qualidade. Essas seqüências foram submetidas ao programa CAP3 para montagem eletrônica, que consiste na comparação entre as seqüências visando o agrupamento

daquelas que são similares, o consenso resultante é denominado de “contig”. As demais seqüências, que não se alinharam entre si foram denominadas de “singlets”. Assim, foram originados 2.655 contigs e 3.367 singlets, totalizando um banco de dados de 6.022 PbAEST’s (“*P. brasiliensis* assembled EST sequence”), os quais correspondem a 6.022 genes expressos deste patógeno, representando aproximadamente 80% do genoma do fungo. A partir daí, as anotações de genes foram feitas por comparação desses PbAEST’s com seqüências disponíveis em bancos de dados públicos. A determinação de genes que são mais ou menos expressos em micélio e em levedura foi feita a partir de subtração eletrônica, que consiste na comparação da freqüência da seqüência em relação ao total de PbAEST’s. Para validação desses dados preliminares, foram realizados experimentos de microarranjos de cDNA, nos quais o cDNA de cada fase foi usado como sonda contra uma membrana de 1.152 genes previamente escolhidos (Felipe *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2006).

Do total de PbAESTs obtidas, 68,3% mostraram homologia com seqüências de fungos depositadas em bancos de dados (GenBank®). Análises posteriores, utilizando-se ferramentas de bioinformática permitiram que 2.931 desse total de PbAEST’s fossem anotadas e categorizadas em 12 grupos, de acordo com a provável função, como mostrado na tabela 1 (Felipe *et al.*, 2005).

**Tabela 1. Categorização funcional de PbAEST’s.** Principais categorias estabelecidas para os transcritos identificados pelo Projeto “Genoma funcional e diferencial de *P. brasiliensis*”, conforme descrito por Felipe *et al.* (2005). As PbAEST’s que apresentaram similaridade com seqüências depositadas em bancos de dados foram categorizadas em 12 grupos de acordo com suas prováveis funções. Modificado de Felipe *et al.* (2005).

Categorias	Porcentagem de PbAEST’s
metabolismo	29%
transcrição	12%
síntese proteica	10%
energia	9%
degradação protéica	9%
ciclo celular e processamento de DNA	8%
mecanismos de transporte celular	5%
facilitação de transporte	5%
controle da organização celular	4%
comunicação celular e transdução de sinal	4%
defesa celular e virulência	3%
morte celular	2%

Cerca de 29% das PbAEST's anotadas estão relacionadas com o metabolismo do fungo. O perfil transcricional da fase miceliana sugere um metabolismo aeróbico, evidenciado pela maior expressão de seqüências codificantes para enzimas participantes do ciclo de Krebs como a isocitrato desidrogenase e succinil-CoA sintetase. Na fase leveduriforme, observa-se a superexpressão da enzima álcool desidrogenase I, o que possibilita a produção de álcool e evidencia o metabolismo, pelo menos parcialmente, anaeróbico. Além disto, enzimas relacionadas com o ciclo do glioxilato, como a isocitrato liase e a malato sintase, bem como as enzimas acetamidase, aminotransferase, PAPS redutase estão superexpressas na fase de levedura, o que permite o consumo de compostos com dois carbonos. Esta diferença de metabolismo pode promover a adaptação e sobrevivência do fungo no interior dos fagossomos de células do tecido hospedeiro, um ambiente pobre em oxigênio. Também está representado no transcriptoma do fungo prováveis genes relacionados com vias clássicas de biossíntese e degradação de lipídeos, biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos, mostrando que à exceção do aminoácido asparagina, o fungo é capaz de produzir e metabolizar todos os aminoácidos e nucleotídeos. Dados relacionados a biossíntese de vitaminas e cofatores também estão presentes, mostrando que ele é capaz de sintetizar riboflavina, FMN, piridoxina, pantotenato, folato, FAD, NAD, NADP, porfirina. Tiamina e biotina provavelmente não são produzidas pelo fungo, uma vez que não foram identificadas seqüências que codificam para enzimas que participam destas vias metabólicas, o que corrobora a necessidade destes compostos no meio de cultivo do *P. brasiliensis*.

Outro dado importante é que 4% de PbAESTs anotadas pertencem a vias relacionadas com comunicação celular e transdução de sinal, relacionadas a diferenciação celular em fungos dimórficos e/ou patogênicos. Os genes que codificam para as proteínas das vias MAPK, PKA/cAMP/Ras1, calcineurina/calmodulina, entre outras foram encontrados no transcriptoma de *P. brasiliensis*, entretanto, pouco se conhece do papel dessas vias no processo de diferenciação deste fungo (Fernandes *et al.*, 2005). Uma via possivelmente relacionada a este processo é a via do AMP cíclico (cAMP)/proteína quinase A (PKA), pois a adição de cAMP exógeno inibe a transição de levedura para micélio (Paris *et al.*, 1985). A calmodulina pertence à família de proteínas que se ligam ao cálcio e participa de diversos processos celulares que envolvem fosfatases, fosfodiesterases e proteínas quinases (Kretsinger, 1980; Lukas *et al.*, 1988; Perrino & Soderling, 1998;

Sonnenburg *et al.*, 1998). A calmodulina também está presente em processos de diferenciação em fungos. De Carvalho e colaboradores (2003) mostraram que inibidores da calmodulina afetaram a diferenciação de micélio para levedura em *P. brasiliensis*, mostrando que a via  $\text{Ca}^{+2}$ /calmodulina deve desempenhar um papel importante na transição dimórfica.

As chaperonas moleculares ou proteínas de estresse também estão presentes no *P. brasiliensis*, como apontado no transcriptoma. Essa classe de proteínas foi primeiramente descrita como HSP (“heat shock protein”) porque seus membros eram superexpressas em resposta ao choque térmico. Hoje, sabe-se que outros tipos de estresse, como oxidativo, osmótico ou baixas temperaturas, podem induzir a expressão das chaperonas moleculares (Siderius *et al.*, 1997; Kandrór *et al.*, 2004; Moraitis & Curran, 2004). Essas proteínas participam do “folding” e da renaturação de proteínas e estão presentes em processos celulares como transição dimórfica em fungos e na imunopatogenicidade de doenças infecciosas (Feder & Hofmann, 1999; Walter & Buchner, 2002; Zügel & Kaufmann, 1999). A análise do transcriptoma mostrou 438 ESTs (184 em micélio e 253 em levedura) que foram agrupadas em 48 tipos distintos de chaperonas e co-chaperonas. Essas proteínas são agrupadas em famílias: pequenas HSP (massa molecular variando de 12 a 43 KDa); HSP40 ou DnaJ (funcionam como co-chaperona das HSP70); HSP60 ou chaperoninas; HSP70; HSP90; HSP100 e outras chaperonas. No *P. brasiliensis* as PbAEST foram assim distribuídas: 3 (três) pequenas chaperonas; 9 (nove) HSP40; 10 (dez) HSP60; 7 (sete) HSP70; 5 (cinco) HSP90; 4 (quatro) HSP100 e 10 (dez) outras chaperonas (Nicola *et al.*, 2005).

É importante ressaltar que, paralelamente, outro projeto transcriptoma de *P. brasiliensis* foi desenvolvido por Goldman e colaboradores (2003). Nesse caso, foi utilizado o isolado Pb18 e foi construída uma biblioteca de cDNA de leveduras cultivadas *in vitro* recuperadas de camundongos infectados.

Os dados obtidos por esses dois projetos permitiram a identificação de genes envolvidos em diversos processos biológicos do fungo, que vem contribuindo para um melhor entendimento da relação patógeno-hospedeiro.

## 1.4. Estresse oxidativo nos sistemas biológicos

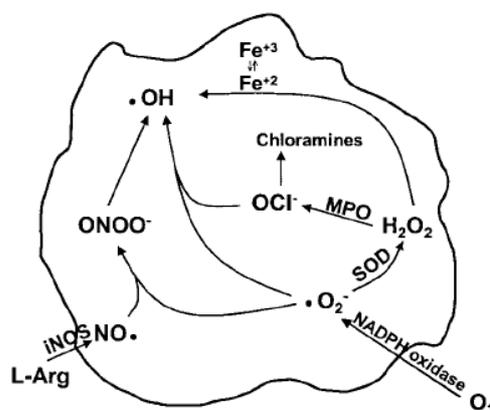
### 1.4.1. Espécies reativas de oxigênio (EROS)

A noção de que o oxigênio exerce efeitos tóxicos através da geração de radicais livres foi proposta por Gerschman e colaboradores em 1954. O termo “estresse oxidativo” foi usado por Fridovich em 1978. Sies (1993) define esse tipo de estresse como um desequilíbrio na célula ou no organismo entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes. O desequilíbrio entre a formação e a remoção das espécies reativas de oxigênio (EROS) no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de danos oxidativos em macromoléculas e estruturas celulares, inclusive podendo resultar na morte celular (Gutteridge, 1993).

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são moléculas de oxigênio em diferentes estados de excitação e/ou redução, bem como compostos de oxigênio com hidrogênio, nitrogênio e cloro. As EROS incluem espécies radicalares e não-radicalares. Radical livre é qualquer espécie capaz de uma existência independente e que contém um ou mais elétrons não-pareados (Halliwell & Gutteridge, 1999). Os radicais livres reagem com espécies não-radicalares, sempre gerando um radical livre. Desse modo, pode ocorrer a amplificação do evento inicial através de uma reação em cadeia (Fridovich, 1998). As espécies primárias incluem o radical superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxil ( $HO^{\bullet}$ ) e o radical hidroperoxil ( $HOO^{\bullet}$ ). Os radicais secundários são produzidos a partir da reação de espécies primárias com constituintes celulares (DNA, lipídeos, proteínas), incluem os hidroperóxidos (ROOH), os radicais peroxil ( $ROO^{\bullet}$ ), peroxinitritos ( $ONOO^{\bullet}$ ) e os epóxidos ou aldeídos (Sigler *et al.*, 1999).

Durante o curso das reações de redução de  $O_2$  a  $2H_2O$  e oxidação de compostos orgânicos a  $CO_2$ , nos ciclos de produção de energia dos organismos aeróbios, cerca de 2 - 3% das moléculas de oxigênio são reduzidas apenas parcialmente, originando as espécies reativas de oxigênio (Ames *et al.*, 1993). Existem duas importantes fontes geradoras de EROS endógenas a cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias e a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos nos peroxissomos. Desta forma as células de organismos aeróbicos estão constantemente expostas a ação das EROS. Outros tipos celulares, como os macrófagos e neutrófilos podem aumentar o consumo de oxigênio e conseqüentemente a produção de

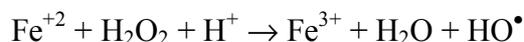
EROS devido a uma resposta fisiológica. Os macrófagos geram radical superóxido através da redução do oxigênio ( $O_2$ ) mediado pela enzima NADPH oxidase; o radical superóxido pode ser dismutado a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ou combina-se com o óxido nítrico (NO) formando o radical peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). A enzima mieloperoxidase (MPO), também presente em macrófagos, converte o peróxido de hidrogênio e o radical clorídrico ( $Cl^-$ ) a ácido hipocloroso (HClO) e outros oxidantes contendo cloro (Gaut *et al.*, 2001). No interior de macrófagos ativados, citocinas específicas ativam a iNOS (óxido nítrico sintase induzível) a converter L-arginina a NO (MacMicking *et al.*, 1987). A toxicidade das espécies reativas de nitrogênio é devido à capacidade delas de reagir diretamente com os anéis aromáticos dos aminoácidos, grupos sulfidril, lipídeos, proteínas e DNA (revisado por Ridnour *et al.*, 2004). O radical peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) também pode inativar enzimas mitocondriais, afetando os ciclos de obtenção de energia da célula (Radi *et al.*, 2002). As principais vias de formação de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e cloro no interior de células fagocitárias estão representadas na figura 1 (extraída de Missall *et al.*, 2004).



**Figura 1. Principais vias existentes no interior das células fagocitárias que geram espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e cloro.** Extraído de Missall *et al.*, 2004.

Outros componentes importantes na geração de EROS são os íons  $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ . O cobre pode ter dois estados redox, o oxidado  $Cu^{2+}$  e reduzido  $Cu^{1+}$ , assim como o ferro que se apresenta como  $Fe^{2+}$  (reduzido) e  $Fe^{3+}$  (oxidado). Os organismos requerem o  $Cu^{2+}$  e  $Fe^{2+}$  como cofatores de diversos processos biológicos como respiração, transporte de íons, proteção contra estresse oxidativo, crescimento celular normal entre outros. Entretanto, o

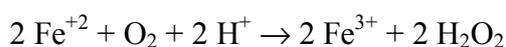
$\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  reagem com o peróxido de hidrogênio, gerando o radical hidroxil ( $\text{HO}^\bullet$ ) através da reação de Fenton (Puig *et al.*, 2002).



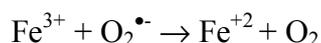
ou



O ferro em presença de oxigênio sofre auto-oxidação, gerando  $\text{Fe}^{3+}$ , que é a forma que entra na célula.



O ferro intracelular ( $\text{Fe}^{3+}$ ) pode reagir com  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , gerado através de processos metabólicos, originando  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{O}_2$ . O peróxido de hidrogênio reage com outro  $\text{Fe}^{2+}$  na reação de Fenton.



O conjunto dessas reações forma uma intrincada rede de ciclagem do ferro nos seus estados redox que produzem EROS (Wisnicka *et al.*, 1998). O radical hidroxil ( $\text{HO}^\bullet$ ) gerado na reação de Fenton é um potente oxidante que ataca a maioria dos compostos orgânicos como os ácidos nucleicos, as proteínas e os lipídeos (Czapski, 1984). O ferro intracelular ( $\text{Fe}^{3+}$ ) não está livre em solução e então ele se liga a poliânions como os ácidos nucleicos ou fosfolipídeos de membranas (Fridovich, 1998). Por estas razões, os níveis intracelulares dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  são controlados cuidadosamente.

O radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) é formado pela redução monovalente do oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) ou a partir da auto-oxidação de compostos como ascorbato, catecolaminas, leucoflavinas, tetrahydropterinos e compostos da cadeia transportadora de elétrons (Fridovich, 1997). O radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) inativa as enzimas desidratases que contêm centros 4Fe-4S, como a enzima aconitase e 6-fosfogluconato desidratase (Valentine *et al.*, 1998).

## 1.4.2. Resposta ao estresse oxidativo

### 1.4.2.1. Defesas antioxidantes

As ações antioxidantes incluem: prevenção da formação de EROS, interceptação das EROS e o reparo dos danos induzidos pelas EROS (Sigler *et al.*, 1999). As defesas contra a toxicidade do O<sub>2</sub> devem estar presentes nas células para minimizar a produção dos radicais livres e para eliminar aqueles radicais cuja produção não podem ser evitada (Fridovich, 1998). Define-se como antioxidante qualquer substância que, presente em baixas concentrações, impede ou adia significativamente a oxidação do substrato. Os antioxidantes evitam a geração de EROS pela remoção de metais, pela remoção através de reações enzimáticas de um oxidante em potencial, ou pela reação direta com as EROS (Sigler *et al.*, 1999).

As enzimas que constituem as defesas antioxidantes primárias são catalase, superóxido dismutase, citocromo c peroxidase, glutathione peroxidase e tioredoxina peroxidase. Também fazem parte da defesa antioxidante: os antioxidantes tiol-específicos; as proteínas que minimizam a disponibilidade dos pró-oxidantes (íons ferro e cobre), como as transferrinas, haptoglobinas e metalotioneínas; as proteínas que protegem as biomoléculas contra o dano por outros mecanismos, como as proteínas de choque térmico; e os metabólitos de baixa massa molecular que removem os radicais livres como a glutathione, bilirrubina, ácido úrico (antioxidantes hidrofílicos) e flavonóides, tocoferol, retinol (antioxidantes lipofílicos). A composição das defesas antioxidantes das células varia de acordo com o tipo celular (Halliwell & Gutteridge, 1999). Sistemas proteolíticos (proteínases e peptidases) que impedem o acúmulo de proteínas danificadas por oxidação constituem as defesas antioxidantes secundárias (Sigler *et al.*, 1999).

A catalase é uma enzima que catalisa a reação  $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ . Esta enzima está amplamente distribuída entre os organismos aeróbicos. São conhecidas três famílias de catalase: manganês-catalase, presente apenas em procariotos; catalase-peroxidase, encontrada em procariotos e eucariotos inferiores e catalase verdadeira (“true catalase”), que são enzimas que contem um grupamento heme e apresentam-se como homotetrâmero encontradas em eucariotos e procariotos (Klotz *et al.*, 1997). Moreira e colaboradores (2004) isolaram e caracterizaram o cDNA completo que codifica para a catalase peroxissomal (catP) de *P. brasiliensis*. Mostraram ainda, que os níveis de proteína e de

mRNA dessa catalase aumentam durante a transição de micélio para levedura, sendo maior na fase de levedura e que a proteína é induzida a partir de 20 minutos após as células serem expostas a 15 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A glutathiona é um importante membro da defesa antioxidante das células. A glutathiona é um tripeptídeo ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinilglicina) que participa da proteção contra o estresse oxidativo mantendo o citosol das células mais reduzido. A glutathiona existe nos organismos na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG). A oxidação da glutathiona é mediada pela glutathiona peroxidase (GPx), usando o peróxido de hidrogênio e hidroxiperóxidos lipídicos como acceptor de elétrons. A glutathiona oxidada (GSSG) é convertida para a forma reduzida pela glutathiona redutase, que utiliza o NADPH como doador de elétrons. O NADP<sup>+</sup> é regenerado a NADPH através da ação da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase. A glutathiona é um dos mais abundantes antioxidantes presentes na célula e conseqüentemente participa na manutenção do estado redox na célula (Jamieson, 1998)

#### — As enzimas superóxido dismutases (SOD)

A descoberta da superóxido dismutase (SOD) foi importante para revelar muitas das propriedades dos sistemas de defesa antioxidante. Em 1938, Mann e Keilin descreveram uma proteína que continha cobre e que havia sido isolada de sangue bovino. Em 1953, proteínas similares foram isoladas de fígado de cavalo. Em 1969, Joe M. McCord e Irwin Fridovich descreveram que estas proteínas presentes nos eritrócitos eram capazes de remover o radical superóxido cataliticamente (Halliwell & Gutteridge, 1999). As enzimas superóxido dismutases fazem parte da defesa primária contra os radicais livres (Fridovich, 1975).

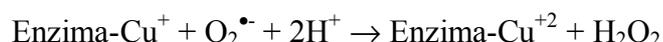
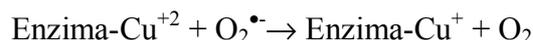
Superóxido dismutases são enzimas antioxidantes que catalisam a dismutação do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> em oxigênio molecular e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, assim ela desvia o curso do radical superóxido, evitando a formação de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio. Para as células que se defendem de um ataque oxidativo no interior de células fagocitárias, este desvio promovido pela SOD do patógeno parece ser benéfico para ele, pois suas células possuem um maior número de sistemas antioxidantes capazes de lidar com o peróxido de hidrogênio do que com o radical peroxinitrito e outras espécies reativas de nitrogênio (Missall *et al.*, 2004).

Existem quatro classes de enzimas SOD, sendo agrupadas de acordo com os cofatores requeridos para a atividade enzimática. Eles podem ser Cu e Zn (CuZnSOD), Mn (MnSOD), Fe (FeSOD) ou Ni (NiSOD). As SOD podem estar presentes no citoplasma, em organelas subcelulares específicas ou serem secretadas pelas células (Fridovich, 1998). Há uma grande similaridade entre as seqüências de aminoácidos das CuZnSOD intracelulares de diferentes organismos, mas não há similaridade entre as seqüências dessas CuZnSOD com as seqüências de aminoácidos das enzimas de diferentes famílias de SOD como as MnSOD ou FeSOD (Kanematsu & Asada, 1991; Smith & Doolittle, 1992).

As CuZnSODs são encontradas no citosol de células eucarióticas, no periplasma de algumas bactérias gram-negativas, nos plastídeos de plantas ou podem ser exportadas para o ambiente extracelular em mamíferos (Fridovich, 1998). Nos eucariotos, apresentam-se na forma de homodímero, com cada subunidade contendo um átomo de cobre e um de zinco (Tainer *et al.*, 1982). As bactérias predominantemente produzem as isoenzimas FeSOD e/ou MnSOD, FeSOD são encontradas como dímeros e as MnSOD como dímeros ou tetrâmeros (Miller & Britigan, 1997).

A CuZnSOD é termoestável e resiste ao estresse osmótico (altas concentrações de uréia e SDS). As CuZnSOD de *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus* mantêm 100% de atividade após 1 hora de tratamento a 50 °C. O fungo *Aspergillus fumigatus* possui uma das formas de CuZnSOD mais resistente à inativação pelo calor, mantendo 100% de atividade após 30 minutos de tratamento a 70 °C (Yoo *et al.*, 1999, Holdom *et al.*, 1996).

Durante o ciclo catalítico das enzimas CuZnSOD, o  $\text{Cu}^{+2}$  passa por mudanças de valência, enquanto o Zn parece ter apenas um papel estrutural (Fridovich, 1998). O  $\text{Cu}^{+2}$  e o  $\text{Zn}^{+2}$  estão ligados a uma ponte de imidazol de uma das histidinas. Esta ponte tem um papel na condução dos prótons. Quando o  $\text{Cu}^{+2}$  é reduzido pelo  $\text{O}_2^{\bullet-}$  a ligação Cu-imidazol é quebrada e o imidazol é protonado. Durante a reoxidação do  $\text{Cu}^{+1}$  pelo próximo radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , a ponte Cu-imidazol é restabelecida enquanto os prótons convertem o  $\text{O}_2$  reduzido em  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fridovich, 1975 e Murphy *et al.*, 1997). Pelo fato das moléculas de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  entrarem em momentos diferentes no sítio ativo da enzima, podemos considerar o mecanismo pelo qual a SOD realiza a dismutação do radical superóxido como sendo do tipo “ping-pong”. Este mecanismo de reação está mostrado abaixo (Liochev & Fridovich, 2003):



A reação catalisada pela SOD produz o  $\text{H}_2\text{O}_2$  que, na presença de  $\text{Fe}^{+2}$ , produz radical hidroxil ( $\text{HO}^\bullet$ ), por meio da reação de Fenton. Geralmente, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é reduzido a  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  pelas catalases e peroxidases e detoxificado do sistema. Entretanto, em uma condição onde existe excesso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e onde o ferro está disponível, a SOD pode atuar como um gerador do  $\text{HO}^\bullet$ .

Em alguns organismos patogênicos, a CuZnSOD é considerada um dos fatores de virulência. Esta enzima do patógeno contribui na proteção contra EROS produzidas pelas células fagocitárias do hospedeiro. Hwang e colaboradores (2002) produziram linhagens mutantes *sod1/sod1* de *Candida albicans* e observaram que eles eram mais sensíveis à menadiona, mais susceptíveis ao macrófago em cultura (sobrevivência de 14,2% do mutante, 55,4% do tipo selvagem e 39,7% da linhagem com fenótipo reconstituído) e apresentaram virulência atenuada em camundongos (os animais infectados com o tipo selvagem ou com a linhagem com fenótipo reconstituído morreram 9 dias após a inoculação, enquanto aqueles animais infectados com a linhagem mutante sobreviveram mais tempo, cerca de 20% dos camundongos estavam vivos 20 dias depois da inoculação).

Trabalhos com *Cryptococcus neoformans* mostram também que a CuZnSOD contribui para a virulência deste fungo (Cox *et al.*, 2003 e Narasipura *et al.*, 2003). Camundongos infectados com linhagens de *C. neoformans* mutantes para o gene da CuZnSOD vivem mais tempo que aqueles infectados com linhagens selvagens. Além disso, o número de células de leveduras recuperadas de macrófagos infectados com mutantes de *C. neoformans* é 2 vezes menor do que o número de leveduras recuperadas de macrófagos infectados com linhagens selvagens de *C. neoformans* (Cox *et al.*, 2003). A CuZnSOD também tem um papel importante na virulência de *A. fumigatus* (Holdom *et al.*, 1996). Estes resultados corroboram o fato desta enzima participar como fator de virulência de fungos patogênicos.

A superóxido dismutase extracelular (EC-SOD) foi identificada por Marklund e colaboradores (1982), a partir da constatação de atividade superóxido dismutase no

plasma, linfa e líquido sinovial em mamíferos. Após isolamento da enzima, verificou-se que se tratava de um tipo de CuZnSOD extracelular. Na maioria das espécies ela é um homotetrâmero, com massa molecular de 135 kDa (Fridovich, 1997). Cada uma das subunidades tem massa molecular de 30 kDa e possui um átomo de zinco e um átomo de cobre. A EC-SOD é uma glicoproteína que é secretada, sendo encontrada em fluidos extracelulares e constitui o principal agente de detoxificação do  $O_2^{\bullet-}$  no espaço extracelular.

A estrutura primária desta enzima indica que ela tem um peptídeo sinal hidrofóbico na porção N-terminal, para secreção, um domínio CuZnSOD na porção média e um domínio de ligação a heparina na porção C-terminal, assinaturas moleculares importantes e que definem uma CuZnSOD secretada nos sistemas vivos. A região ligante a heparina consiste de uma seqüência de 6 aminoácidos básicos que são responsáveis pela afinidade com análogos da heparina, o que permite a interação com proteoglicanas localizadas na superfície celular. Adicionalmente a região de ligação a heparina desta enzima permite translocá-la para o núcleo em células de mamíferos, pois representa sinal de localização nuclear (NLS). Atualmente a EC-SOD é a única enzima antioxidante conhecida que se citolocaliza no núcleo, podendo participar na modulação do estado redox nuclear ou regulando a expressão gênica (Ookawara *et al.*, 2003).

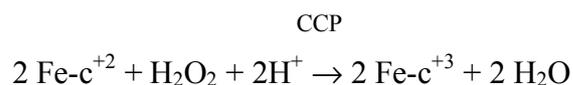
Em modelos de estudo de mamíferos, principalmente homem e camundongo, foi relatada a participação da EC-SOD em diversas doenças, principalmente doenças no pulmão. Animais que não possuem esta enzima apresentam maior dano no pulmão causado por hiperóxia, asbestos e bleomicina (Carlsson *et al.*, 1995; Folz *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 2004). Existem poucas EC-SOD caracterizadas em fungos, mas por ser a única enzima antioxidante presente no espaço extracelular, presume-se que ela desempenhe funções relevantes principalmente nos eventos relacionados à interação parasita-hospedeiro. Em estudos com *Candida albicans*, Fradin e colaboradores (2005) mostraram que leveduras expostas a sangue enriquecido com neutrófilos tiveram seu crescimento prejudicado e induziram a expressão de vários genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo, entre eles, SOD5, um gene que codifica para uma enzima da família CuZnSOD, GPI-ancorada e localizada na parede celular. Ainda mostraram que mutantes para esse gene  $\Delta sod5$  são menos virulentos em modelos de infecção em camundongos e diminuem significativamente a capacidade de sobrevivência após incubação com sangue e sangue enriquecido com neutrófilos.

## — A enzima citocromo c peroxidase (CCP)

As peroxidases são enzimas que usam vários doadores de elétrons para reduzir o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$ . Algumas peroxidases podem também reduzir os hidroperóxidos aos seus correspondentes álcoois. Exemplos de peroxidases são a citocromo c peroxidase (CCP), a ascorbato peroxidase, a NADPH peroxidase (hidroperóxido redutase) e a glutatona peroxidase (GPx) (Fridovich, 1998).

A GPx promove a remoção do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), oxidando a glutatona (GSH) a GSSG (Fridovich, 1998). A glutatona é um dos principais antioxidantes existentes na célula, conferindo proteção principalmente contra o peróxido de hidrogênio.

A enzima citocromo c peroxidase (CCP) catalisa a redução do peróxido de hidrogênio usando o citocromo c como doador de elétrons:



Esta enzima foi descoberta em *Saccharomyces cerevisiae* por Altschul, Abrams e Hogness em 1940 e está localizada nas mitocôndrias dessas leveduras crescidas aerobicamente. Esta enzima protege o organismo dos danos causados por altas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

O gene que codifica para CCP de *S. cerevisiae* foi isolado em 1982 por Kaput e colaboradores e contém uma região codante de 68 aminoácidos correspondente ao peptídeo sinal responsável pela exportação da enzima para o espaço intermembrana da mitocôndria, que será posteriormente clivado, originando a proteína madura, com 294 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular de 34,2 kDa (Erman & Vitello, 2002).

Em *S. cerevisiae* foram realizados experimentos utilizando o gene da  $\beta$ -galactosidase como gene repórter para verificar a resposta quantitativa da expressão do gene de CCP sob várias condições de crescimento. Verificou-se que as leveduras crescidas aerobicamente até a fase estacionária têm o gene da CCP de 8-10 vezes mais expresso que nas leveduras crescidas anaerobicamente. Isso mostra que as EROS produzidas durante o crescimento aeróbico aumentam a expressão do gene da CCP, confirmando assim o papel biológico desta enzima de remoção do  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido durante a respiração. Leveduras

crescidas até a fase exponencial foram tratadas com uma concentração subletal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acrescido do inibidor da catalase (aminotriazol) e apresentam uma expressão 3 vezes maior do gene da enzima CCP, em relação às células não tratadas. A exposição de leveduras a 1 mM de peroxinitrito (o produto da rápida reação entre o radical superóxido e o NO) por 1 hora, resulta numa expressão 2 vezes maior do gene que codifica para a enzima CCP quando comparadas a células controle. Estes resultados indicam que a CCP também pode ajudar na eliminação do peroxinitrito (Kwon *et al.*, 2003). Assim, a presença desta enzima em fungos patogênicos pode auxiliar o patógeno a sobreviver ao ataque de macrófagos.

Na levedura *S. cerevisiae* o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é catabolizado enzimaticamente pelas enzimas catalase e citocromo c peroxidase. A levedura *S. cerevisiae* possui dois tipos de catalase, uma peroxissomal e uma citoplasmática. Foram obtidos mutantes de *S. cerevisiae* com apenas uma das catalases (peroxissomal ou citoplasmática) e sem ambas as catalases. Na ausência de estresse oxidativo, o tipo selvagem e o mutante sem as duas catalases apresentaram o mesmo crescimento, evidenciando que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno é detoxificado principalmente pela CCP ou por outros mecanismos. O aumento da atividade da catalase não é suficiente para a aquisição de resposta adaptativa ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo necessário também um aumento da atividade da CCP. As células de *S. cerevisiae* foram pré-tratadas com 0,2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 hora e a atividade da catalase nas células com apenas uma das catalase aumenta 2 vezes e a atividade da CCP aumenta de 2,4 a 2,7 vezes, inclusive na linhagem selvagem e no mutante sem ambas as catalases, em relação às atividades dessas enzimas na ausência de peróxido de hidrogênio. Entretanto, quando se compara a sobrevivência dos mutantes pré-tratados e desafiados com tratamento de 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com aquela dos que foram submetidos diretamente ao estresse oxidativo de 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, todas as linhagens apresentaram mortalidade semelhante entre si, ou seja o pré-tratamento não aumentou a sobrevivência de cada uma das linhagens mutante. Esses dados evidenciam que apenas o aumento da atividade da CCP e outras defesas, não é capaz de proporcionar o desenvolvimento de uma resposta adaptativa suficiente para aumentar a sobrevivência das células, sendo a catalase importante para a resposta adaptativa (Izawa *et al.*, 1996).

Giles e colaboradores (2005) identificaram e caracterizaram *in silico* a seqüência nucleotídica da citocromo c peroxidase (*CCP1*) de *Cryptococcus neoformans*. Além disso, eles obtiveram mutantes para o gene que codifica para a CCP1 desse fungo e observaram que o crescimento dos mutantes foi afetado pela presença de peróxido de hidrogênio

quando comparado com o tipo selvagem. Entretanto, o mutante apresentou-se tão virulento quanto o tipo selvagem no modelo de infecção em camundongos, sugerindo que o sistema de defesa antioxidante no que se refere à degradação do peróxido de hidrogênio deve ser redundante, com outras peroxidases (glutationa ou tioredoxina peroxidase) compensando a perda de função da citocromo c peroxidase.

### 1.4.3. Respostas adaptativas ao estresse

Nos últimos anos, tem-se investigado se os organismos possuem uma resposta global ao estresse. Sabe-se que as vias de resposta aos diferentes tipos de estresse são distintas, porém tem-se observado algum tipo de proteção cruzada entre as respostas aos diversos tipos de estresse (térmico, osmótico, oxidativo). Alguns organismos submetidos a níveis sub-letais de um tipo de estresse são capazes de induzir uma resposta adaptativa protetora quando submetidos subsequente a outro tipo de estresse normalmente letal.

Em *Aspergillus niger* observou-se o aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase quando suas células foram cultivadas em temperaturas de 50 °C, 60 °C e 80 °C, valores acima da temperatura ótima (30 °C). Este aumento da atividade enzimática foi observado tanto no choque térmico de curta duração (10 e 20 minutos) quanto naquele de longa duração (120 e 360 minutos), sugerindo uma associação entre estresse térmico e oxidativo (Abrashev *et al.*, 2005). Em outro estudo, leveduras de *S. cerevisiae* foram cultivadas a 23 °C até a fase exponencial e depois foram transferidas para 37 °C por 1 hora. Após esse pré-tratamento as células foram submetidas a estresse oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou menadiona (gerador de radical superóxido no meio intracelular). Observou-se que a taxa de sobrevivência da cultura de *S. cerevisiae* submetidas ao choque térmico prévio e depois ao tratamento com menadiona (35 mM) foi 10 vezes maior que a taxa de sobrevivência da cultura não submetida ao pré-tratamento, enquanto a cultura submetida ao choque térmico prévio e depois ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,5 mM) teve taxa de sobrevivência 70 vezes maior que a cultura não submetida ao pré-tratamento, evidenciando que a resposta ao peróxido de hidrogênio e ao radical superóxido são distintas entre si e da resposta ao choque térmico, mas há algum grau de sobreposição nos mecanismos de proteção (Jamieson, 1992).

Em *S. cerevisiae*, mostrou-se que a Hsp104p regula o estado redox das células e promove a termotolerância. Mutantes *hsp104Δ* apresentaram taxa de sobrevivência de

aproximadamente 30% após choque térmico de 50 °C por 15 minutos, enquanto as células que expressam a proteína Hsp104p tiveram taxa de sobrevivência superior a 55% após o choque térmico. Ao serem submetidos ao estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (3mM) ou menadiona (0,5 mM) por 20 minutos, os mutantes para Hsp104p apresentaram taxa de sobrevivência de aproximadamente 30%, enquanto o tipo selvagem apresentou taxa de sobrevivência de aproximadamente 80%, evidenciando um papel protetor dessa proteína contra o estresse oxidativo. A Hsp104p tem um papel importante na manutenção da viabilidade celular em células que são expostas ao choque térmico, participando da ressolubilização de proteínas que foram agregadas em consequência de estresse severo. Na ausência dessa proteína, a mitocôndria perde a integridade de sua membrana e conseqüentemente o controle da cadeia transportadora de elétrons, aumentando a formação de EROS intracelular. (Ueom *et al.*, 2003).

Noventa-Jordão e colaboradores (1999) demonstraram que em *A. nidulans* as defesas antioxidantes induzidas pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são responsivas ao calor. As linhagens de *A. nidulans* apresentaram uma taxa de sobrevivência 4 vezes maior após choque térmico de 50 °C por 45 minutos seguido de tratamento com peróxido de hidrogênio (50 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 20 minutos) em relação às linhagens que foram apenas submetidas ao choque térmico de 50°C por 45 minutos. Porém, quando as culturas foram tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e posteriormente submetidas ao choque térmico, a taxa de sobrevivência é semelhante àquela de culturas submetidas apenas ao choque térmico. Estes dados sugerem que proteínas induzidas após estresse oxidativo podem ajudar na recuperação das células submetidas ao choque térmico.

As respostas adaptativas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ao O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e ao choque térmico são distintas, mas têm alguns mecanismos de proteção em comum. O choque térmico leva a indução de uma resposta adaptativa em relação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, em uma extensão menor, à menadiona. Alguns genes que são induzidos por choque térmico, estresse osmótico, dano ao DNA e peróxido de hidrogênio possuem em seu promotor várias repetições de um motivo chamado elemento de resposta ao estresse (STRE) (Jamieson, 1998). O STRE é um elemento regulatório cis capaz de mediar o aumento da transcrição de vários genes induzidos por diferentes formas de estresse. O STRE tem como seqüência consenso AGGGG e a presença do STRE na região promotora de um gene não implica em um padrão de expressão uniforme do mesmo (Estruch *et al.*, 2000). Em *C. albicans* genes que são induzidos por estresses oxidativo, térmico e osmótico tem em sua região promotora

motivos STRE (Enjalbert *et al.*, 2003). Em *S. cerevisiae*, os fatores trans Msn2p e Msn4p estão envolvidos na expressão gênica mediada pela STRE. Os fatores transcricionais Yap1p (homólogo a Cap1p de *C. albicans*) e o Skn7 também participam da proteção contra o estresse oxidativo (Jamieson, 1998). Em *S. cerevisiae*, postula-se que Skn7p esteja sempre presente no núcleo e que quando há presença de estresse osmótico, Sln1p se autofosforila, transfere o grupamento fosfato para Ypd1p, que fosforilado migra para o núcleo e transfere o grupamento fosfato para Skn7p, ativando a expressão de genes por ele regulado.

Em *C. albicans*, a via HOG MAPK (“high osmolarity glycerol” “mitogen-activated protein kinase”) é uma das principais vias de transdução de sinal capaz de perceber o estresse oxidativo e gerar uma resposta transcricional para a adaptação das células. Esta via foi inicialmente descrita em *S. cerevisiae*, onde foi relacionada à sinalização e adaptação ao estresse osmótico. A via HOG MAPK envolve vários passos de fosforilação e transferência do grupamento fosfato que vão determinar a ativação da via. Em células responsivas ao estresse, uma proteína de membrana histidina quinase, Sln1p, funciona como um sensor desse sinal. Na ausência de estresse, Sln1p se autofosforila num resíduo de histidina e transfere o grupamento fosfato para o seu resíduo de aspartato. O grupamento fosfato é transferido para um resíduo de histidina da proteína Ypd1p e depois para o resíduo de aspartato da proteína Ssk1p. A Ssk1p fosforilada é incapaz de induzir a ativação de Ssk2p uma MAPKKK da cascata de sinalização da via HOG MAPK. Em condições de estresse osmótico (*S. cerevisiae*) ou oxidativo/osmótico (*C. albicans*), a transferência do grupamento fosfato não ocorre através de Sln1p – Ypd1p – Ssk1p e a Ssk1p não fosforilada ativa Ssk2p, que por sua vez, ativa Pbs2p (uma MAPKK) e finalmente Hog1p (uma MAPK). Hog1p fosforilado é translocado para o núcleo e inicia a transcrição de genes associados a adaptação por essa via. Outro mecanismo de ativação de Hog1p envolve a proteína Sho1p, presente na membrana, que ao interagir com Pbs2p ativa Hog1p. Em *S. cerevisiae*, essa via só é ativada na presença de alta osmolaridade. O Skn7p é uma proteína reguladora que age como fator transcricional de forma independente da via HOG MAPK (Chauhan *et al.*, 2006). A relação entre Cap1p, Hog1p e a resposta global ao estresse ainda não estão completamente elucidadas.

Recentemente, tem-se mostrado que, em eucariotos, o sistema de histidina quinase de dois componentes, além de participar das vias de transdução de sinal que respondem às mudanças ambientais, participam de processos mais globais como a transição morfológica

e virulência. A seqüência deduzida do gene denominado *DRK1* de *Blastomyces dermatitidis* possui os domínios e elementos necessários, como H-box e D-box relacionados à transferência de grupamento fosfato, característicos de uma proteína histina quinase, sendo homólogo ao gene *SLNI* de *S. cerevisiae*. Estudos em *B. dermatitidis* mostraram que mutantes para *DRK1* foram incapazes de fazer a transição dimórfica, além de apresentarem alterações na morfogênese, composição da parede celular, esporulação e na expressão de genes de virulência. Adicionalmente, o gene *DRK1* foi silenciado por RNAi em *B. dermatitidis* e *H. capsulatum*. Os transformantes obtidos apresentaram redução na expressão de genes de virulência ou fase-específica, defeitos na morfologia, formação de pseudo-hifa a 37 °C e redução na esporulação. Para verificar o papel de *DRK1* na patogenicidade, linhagens diferentes de *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* com gene *DRK1* silenciado foram usadas para infecção de camundongos, e todas as linhagens testadas mostraram-se drasticamente menos virulentas (Nemecek *et al.*, 2006). Neste contexto, questiona-se sobre os sinais ambientais percebidos por estes fungos que são capazes de regular a transição dimórfica e virulência, potenciais sinais percebidos por este sistema são: temperatura, estresse oxidativo e osmótico, estresse nutricional, fatores oriundos do hospedeiro, como hormônios. O sistema de sinalização de dois componentes é composto genericamente de uma histidina quinase (HK), que percebe o sinal e uma proteína de resposta (RR, “response regulator”) que repassa o sinal, através da ativação direta da transcrição de genes ou de uma cascata de sinalização MAPK. Este sistema de sinalização permite a integração de múltiplos sinais ambientais em uma via única de resposta ou insere pontos de comunicação entre as vias de resposta. Outra possibilidade, é que um conjunto de RR possa coordenar a resposta adaptativa apropriada para cada tipo de sinal percebido (Catlett *et al.*, 2003).

## 2. JUSTIFICATIVA

*P. brasiliensis* é um fungo dimórfico, cuja transição da forma miceliana para a forma leveduriforme está associada à mudança de temperatura. Ainda não estão elucidados quais os processos celulares que são regulados durante a transição morfológica e como tais processos estão relacionados com a patogenicidade deste organismo. Portanto, é de grande interesse conhecer quais os genes que são diferencialmente expressos nas duas fases, para que se possa conhecer em quais processos eles estão envolvidos.

Condições de estresse térmico e oxidativo podem ser deletérias para as funções das células, assim é importante conhecer os sistemas antioxidantes que estão presentes em organismos que já estão adaptados ao estresse térmico. Em outros fungos, existe uma relação entre a resposta ao estresse oxidativo e a resposta ao choque térmico. Ao compreender o mecanismo e o contexto de ação das enzimas antioxidantes como a citocromo c peroxidase e superóxido dismutase, poderemos entender como o patógeno resiste ao estresse oxidativo e como isto está ligado à resistência às mudanças térmicas. Essas duas enzimas têm funções complementares, pois a superóxido dismutase retira do ambiente radical superóxido produzindo peróxido de hidrogênio e, a citocromo c peroxidase reduz o peróxido de hidrogênio a água.

Além disso, o *P. brasiliensis* é um patógeno intracelular facultativo que entra em contato com células fagocitárias humanas. No interior de macrófagos, o patógeno provavelmente sofre um ataque por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Portanto, faz-se necessário elucidar os tipos de defesas antioxidantes que o fungo apresenta para evadir o sistema de defesa e desenvolver a doença e como elas contribuem para a sobrevivência do microrganismo no hospedeiro. Dessa forma, a caracterização molecular dos genes que codificam as enzimas citocromo c peroxidase e superóxido dismutase extracelular e a análise da expressão de seus genes em processos relacionados à infecção do hospedeiro fornecerá informações importantes no que se refere a patobiologia de *P. brasiliensis*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral:

Caracterizar os cDNAs e analisar a expressão por northern blot dos genes que codificam para as enzimas citocromo c peroxidase e superóxido dismutase GPI-ancorada durante o processo de transição dimórfica e no choque térmico.

#### 3.2. Objetivos específicos:

- Caracterizar as seqüências dos cDNA referentes às enzimas antioxidantes superóxido dismutase GPI-ancorada e citocromo c peroxidase. A seqüência do cDNA correspondente à enzima superóxido dismutase GPI-ancorada foi completamente seqüenciado e para a citocromo c peroxidase será apresentada a seqüência parcial do cDNA correspondente;
- Determinar o número de cópias dos genes que codificam para as enzimas citocromo c peroxidase e superóxido dismutase GPI-ancorada, por meio da técnica de Southern blot;
- Analisar a expressão dos genes das enzimas superóxido dismutase GPI-ancorada e citocromo c peroxidase nas condições experimentais de transição morfológica *in vitro* e choque térmico, por meio da técnica de northern blot;
- Determinar a atividade da enzima citocromo c peroxidase durante o choque térmico de 36 °C para 42 °C;
- Determinar a atividade da enzima superóxido dismutase GPI-ancorada, no sobrenadante da cultura de células de levedura a 36 °C.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

#### 4.1.1. Meios de Cultivo

- Meio LB

Peptona	1% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	1% (p/v)

O pH foi ajustado para 7,0. Para o preparo de meio LB sólido, acrescentou-se 1,5% de ágar bacteriológico.

- Meio YPD

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona	2% (p/v)
Glicose	2% (p/v)

O pH foi ajustado para 7,2.

- Meio BHI (“brain heart infusion”) (Singer-Vermes *et al.*, 1992)

BHI	3,7 g/L
Glicose	1,0 g/L

O pH foi ajustado para 7,2. O meio foi suplementado com fator de crescimento (50 mL/L), soro de cavalo com complemento inativado (40 mL/L), penicilina (0,05 U/mL) e neomicina (20 µg/mL). Para o preparo de meio BHI sólido, foram acrescentados 20 g/L de ágar bacteriológico.

- Meio Fava-Netto

Protease peptona	0,3 g/L
Peptona	1,0 g/L
Extrato de carne	0,5 g/L
Glicose	4,0 g/L
Extrato de levedura	0,5 g/L
NaCl	0,5 g/L
Ágar bacteriológico	1,6 g/L

O pH foi ajustado para 7,2.

- Meio N (Negroni, 1966)

Neopeptona	3% (p/v)
Glicose	1,8% (p/v)
Tiamina	0,009% (p/v)
Asparagina	0,125% (p/v)

O pH foi ajustado para 7,2.

Todos os meios foram autoclavados por 15 minutos a 120 °C após o preparo.

#### **4.1.2. Antibióticos e fator de crescimento de *P. brasiliensis***

- Ampicilina

Solução estoque: 100 mg/mL

Concentração final de uso: 100 µg/mL

A ampicilina foi dissolvida em água bidestilada, esterilizada por filtração em membrana Millipore de 0,2 µm e armazenada a -20 °C.

- Penicilina

Solução estoque: 500 U/mL

Concentração final de uso: 0,05 U/mL

A penicilina foi dissolvida em água bidestilada, esterilizada por filtração em membrana Millipore de 0,2 µm e armazenada a 4 °C.

- Neomicina

Solução estoque: 200 mg/mL

Concentração final de uso: 20 µg/mL

A neomicina foi dissolvida em água bidestilada, esterilizada por filtração em membrana Millipore de 0,2 µm e armazenada a 4 °C.

- Fator de crescimento

Duas alças do isolado 192 (Laboratório de Imunologia, ICB, Universidade de São Paulo) de *P. brasiliensis* foram inoculadas em 500 mL de meio BHI e crescidas por 7 dias em banho a 36,5 °C. Após esse período, a cultura foi centrifugada a 4.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, armazenado a -20 °C e usado como fator de crescimento.

#### **4.1.3. Southern blot**

- Tampão TAE 50 X

Tris base                                2 M

EDTA                                        50 mM

O pH foi ajustado para 8, utilizando-se aproximadamente 57 mL/L de ácido acético glacial.

- Solução de depuração

HCl                                         0,125 M

- Solução de desnaturação

NaCl 1,5 M

NaOH 0,5 M

- Tampão de neutralização

NaCl 1,5 M

Tris base 0,5 M

O pH foi ajustado para 7,5 com HCl concentrado.

- Tampão de transferência SSC 20 X

Citrato de sódio 0,3 M

NaCl 3 M

O pH foi ajustado para 8.

- Solução de hibridização

À solução de hibridização (“hybridization buffer”) fornecida pelo kit “AlkPhos Direct labelling and detection system” (Amersham Biosciences – GE Healthcare), acrescentou-se NaCl para uma concentração final de 0,5 M e reagente bloqueador para uma concentração final de 4% (p/v). O volume de solução de hibridização preparado foi 0,125 mL/cm<sup>2</sup> de membrana, de acordo com as recomendações do fabricante.

- Solução para primeira lavagem

Uréia 2 M

SDS 0,1% (p/v)

NaCl 150 mM

Reagente bloqueador 0,2% (p/v)

Solução de fosfato de sódio 0,5 M, pH 7 50 mM

Solução de MgCl<sub>2</sub> 1 M 1 mM

- Solução para segunda lavagem 20 X (solução estoque)

Tris base 1 M

NaCl 2 M

O pH foi ajustado para 10 e conservado 4 °C.

- Solução para segunda lavagem (solução de uso)

A solução estoque foi diluída 1:20 e acrescida de 2 mL/L de solução de MgCl<sub>2</sub> 1 M (obtendo-se uma concentração final de 2 mM de magnésio). Esta solução não pode ser estocada e foi preparada imediatamente antes do uso.

#### 4.1.4. Northern blot

- MOPS 10 X

MOPS	0,2 M
EDTA	10 mM
Acetato de sódio	50 mM

O pH foi ajustado para 7 com NaOH. Todos os reagentes usados eram livres de contaminação com RNase.

- SSPE 20 X

NaCl	3 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,2 M
EDTA	20 mM

O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH.

- Gel de agarose desnaturante

Agarose	1,5% (p/v)
Formaldeído 37%	0,6 M
MOPS 10 X	1 X

Todos os reagentes usados eram livres de contaminação com RNase.

- Tampão de amostra desnaturante

formamida	26,25 mL
MOPS 10 X	5,25 mL
Formaldeído 37%	8,40 mL
Glicerol 100%	3,50 mL
Água ultrapura	6,30 mL
Azul de bromofenol	0,28 g

Todos os reagentes usados eram livres de contaminação com RNase. O tampão foi dividido em alíquotas e armazenado a -20 °C .

- Solução de hibridização

Formamida	50% (v/v)
SSPE 20 X	4 X
Solução de Denhardt's 50 X	5 X
SDS 10%	0,1% (p/v)

A solução de pré-hibridização tem a mesma composição descrita acima, sendo acrescida de solução de DNA de esperma de arenque sonificado 10 mg/mL, para concentração final 100 µg/mL. Antes de ser adicionada, a solução de DNA foi descongelada e fervida por 5 minutos.

#### **4.1.5. Preparo de extrato protéico e medida da atividade enzimática**

- Tampão Tris-cálcio

Tris-HCl pH 8,8	20 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM

- Tampão fosfato de potássio (KPi) 0,1 M

Adicionou-se 13,609 g de fosfato de potássio monobásico a 900 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura. O pH da solução foi ajustado para 6,8 ou para 7,2, de acordo com a necessidade, e o volume foi completado para 1000 mL. A solução foi estocada a 4 °C.

- Solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Solução estoque: 30% (~ 8,8 M)

A solução foi esterilizada por filtração em membrana Millipore de 0,2 μm e estocada, protegida da luz, a 4 °C. Para confirmar a concentração do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi feita uma diluição da solução estoque de 8,8 M para 100 mM. A solução 100 mM foi diluída 10 vezes e foi feita a leitura de absorbância a 240 nm. A absorbância da solução 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deve ser de 0,44.

- Solução de citocromo c

Solução estoque: 14 mg/mL de citocromo c de cavalo em tampão KPi (pH 6,8).

A solução estoque foi dividida em alíquotas de 1,5 mL e armazenada protegida da luz a -20 °C. Antes do uso, acrescentou-se 1 ou 2 cristais de ditionito de sódio a uma alíquota da solução de citocromo c descongelada a fim de reduzir o citocromo c.

- Solução de 2-Mercaptoetanol

Solução estoque: 40 mM de 2-mercaptoetanol em água ultrapura.

A solução foi armazenada protegida da luz a temperatura ambiente.

- Solução de NADH

Solução estoque: 2,5 mM de NADH em água ultrapura.

A solução foi armazenada protegida da luz a -20 °C por, no máximo, 2 semanas.

- Solução de MnCl<sub>2</sub>/EDTA

Solução estoque: 80 mM de EDTA e 40 mM de MnCl<sub>2</sub> em água ultrapura.

A solução foi armazenada a temperatura ambiente por, no máximo, 1 semana.

## **4.2. Métodos**

### **4.2.1. Transição de micélio para levedura**

O isolado Pb01 (coleção ATCC-MYA-826, Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás) foi cultivado em meio N líquido a 22 °C por 48 horas. A cultura foi transferida para banho a 36 °C sob agitação de 130 rpm e as células foram coletadas nos tempos 0, 0.5, 1, 2, 6, 24 horas e 15 dias (L) após a mudança de temperatura. Em seguida, as células foram utilizadas para extração de RNA.

### **4.2.2. Choque térmico**

O isolado Pb01 foi cultivado em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio YPD, a 36 °C sob agitação de 130 rpm. Aliquotas de 15 mL da cultura foram transferidas para tubos falcon de 50 mL e incubadas no banho a 42 °C sob agitação de 130 rpm durante os tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. A concentração celular utilizada nos tratamentos foi de  $10^5$  células por mL. As células foram centrifugadas logo após o tratamento por 2 minutos a 3.000 x g e congeladas em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA e preparo de extrato protéico.

### **4.2.3. Extração de RNA**

O RNA foi extraído com o reagente trizol (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. As células foram coletadas por centrifugação a 3.000 x g por 2 min e lavadas duas vezes com água livre de contaminação com RNase (5.000 x g por 30 segundos, cada lavagem). As células (3 g de peso úmido) foram maceradas com pistilo e nitrogênio líquido em almofariz de porcelana até obtenção de um pó fino o qual foi transferido para um tubo e homogeneizado com 8 mL de trizol. A suspensão obtida foi centrifugada a 10.000 x g por 20 segundos e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Esta solução foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, sendo depois adicionados 0,2 mL de clorofórmio para cada 1 mL de trizol inicial. O tubo foi invertido várias vezes para homogeneização e centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e foram adicionados 0,5 mL de isopropanol para cada 1 mL de trizol inicial. Após incubação por 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugou-se a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O RNA precipitado foi lavado uma vez com etanol 75%

e deixado a temperatura ambiente para secar. O RNA foi ressuscitado em volume apropriado de água ultrapura, livre de contaminação com RNase e estocado a -80 °C.

#### **4.2.4. Extração de DNA**

O procedimento experimental é baseado no método descrito por Raeder, U. e Broda, P. (1985).

O micélio foi macerado com pistilo e nitrogênio líquido em almofariz de porcelana até obtenção de um pó fino. Esse pó foi colocado em tubo de 2 mL (cerca de 50 mg de micélio por tubo) e ressuscitado em 500 µL de tampão de extração (200 mM de Tris-HCl, pH 8,5; 250 mM de NaCl; 25 mM de EDTA; 0,5% (p/v) de SDS). Essa suspensão foi misturada em vortex por 15 minutos, e em seguida foram adicionados 500 µL de clorofane. Misturou-se em vortex, e centrifugou-se por 1 hora a 12.000 x g. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e tratada com a enzima RNase A numa concentração final de 100 µg/mL por 15 minutos em banho a 37 °C. Após esse tratamento, adicionou-se igual volume de clorofórmio, misturou-se vigorosamente (uso de vortex) e centrifugou-se a 12.000 x g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para novo tubo, foram adicionados 0,5 V de isopropanol e a solução foi centrifugado a 12.000 x g, por 20 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a temperatura ambiente e ressuscitado em volume apropriado de água.

#### **4.2.5. Extração de DNA plasmidial em pequena escala**

O clone de *Escherichia coli* de interesse foi crescido em 5 mL de meio LB com ampicilina (100 µg/mL) a 37 °C sob agitação de 250 rpm por aproximadamente 16 horas. A cultura foi transferida para um tubo de 1,5 mL e as células foram precipitadas por centrifugação a 10.000 x g por 1 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 200 µL de solução I (50 mM de glicose, 25 mM de Tris-HCl, 10 mM de EDTA pH 8,0). Foram acrescentados 360 µL de solução II fresca (0,2 M de NaOH, 1% (p/v) de SDS). O tubo foi invertido várias vezes e deixado a temperatura ambiente por 5 minutos. Foram acrescentados 300 µL de solução III gelada (60 mL de acetato de potássio 5 M; 11,5 mL de ácido acético glacial e 28,5 mL de água), o tubo foi invertido várias vezes e deixado no gelo por 5 minutos. Centrifugou-se a 10.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e foram acrescentados 750 µL de isopropanol.

O tubo foi invertido várias vezes e deixado a temperatura ambiente por 5 minutos. Centrifugou-se a 12.000 x g por 5 minutos a 4 °C. O precipitado foi ressuspensionado em 200 µL de TE (10 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 1 mM de EDTA pH 8,0) e acrescentados 110 µL de acetato de amônio 7,5 M. Após vigorosa mistura (com uso de vortex), centrifugou-se a 10.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e foram acrescentados 750 µL de etanol 100%. O álcool foi misturado à solução invertendo-se o tubo várias vezes e a solução foi centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos. O precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70%. O precipitado final obtido foi seco a temperatura ambiente e ressuspensionado em volume apropriado de água contendo 1 µL de RNase A (10 mg/mL).

#### **4.2.6. Seqüenciamento automático**

O seqüenciamento foi realizado empregando o kit “DYEnamic<sup>TM</sup>ET - Dye terminator” e o seqüenciador automático “MegaBACE 1000” (GE Healthcare). Foram preparadas reações para seqüenciamento em placas de 96 poços, em um volume final de 5 µL contendo 100 – 200 ng de DNA e 5 picomoles do iniciador universal (5'-CCCAGTC ACGACGTTGTAAAACG-3') ou reverso (5'-AGCGGATAACAATTTACACACAGG-3'). Os demais componentes da reação de seqüenciamento foram adicionados, conforme protocolo padrão fornecido pelos fabricantes.

#### **4.2.7. Quantificação de ácidos nucleicos**

O RNA e o DNA obtidos foram quantificados no “GeneQuant<sup>TM</sup>pro” (GE Healthcare) e em gel de agarose 0,8% (p/v) em TAE 1 X, contendo brometo de etídeo na concentração final de 0,5 µg/mL. Para a eletroforese do RNA, todos os reagentes e as condições de preparo do gel foram livres de contaminação com RNase. O gel também foi utilizado com o objetivo de verificar a integridade das amostras de ácidos nucleicos.

#### **4.2.8. Preparo da sonda**

Bactérias *Escherichia coli* proveniente do banco de EST contendo a seqüência de cDNA escolhida foram plaqueadas em meio LB sólido com ampicilina a partir do estoque de células armazenado a -80 °C. Após crescimento durante a noite em estufa a 37 °C, colônias isoladas foram inoculadas em meio líquido para extração de DNA plasmidial em pequena escala. Esse plasmídeo foi usado como molde na seguinte reação de PCR, com

volume final de 50 µL: 100 pg de DNA; 0,2 mM de dNTP; 2,5 U de enzima *Taq* DNA polimerase (Cenbiot, Brasil); 1 X de tampão da enzima; 0,04 µM de cada oligonucleotídeo T3 (5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3') e T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'); 2mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mg/mL BSA. As condições de reação de PCR foram desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 94 °C/1min, 58 °C/1min, 72 °C/1min, seguidos de extensão final a 72 °C por 7 minutos.

As sondas para os genes que codificam para as enzimas PbSOD3 e PbCCP têm tamanho de aproximadamente 850 pb e 750 pb, respectivamente.

#### 4.2.9. Southern blot

O DNA total do isolado Pb01 foi quantificado no “GeneQuant™*pro*” (GE Healthcare) e aproximadamente 15 µg de DNA foram digeridos com diferentes enzimas de restrição, usando-se 10 U/µg de DNA. Todas as digestões foram realizadas utilizando-se apenas uma enzima de restrição por sistema. As enzimas e tampões utilizados foram: *Apa*I, 10 U/µL e tampão A 10 X (Promega); *Sac*II, 20 U/µL e tampão NEB4 10 X (BioLabs); *Eco*RI, 12 U/µL e tampão H 10 X (Promega); *Hind*III, 10 U/µL e tampão E 10 X (Promega). As quantidades a serem usadas em cada sistema foram calculadas e em seguida foram pipetados os volumes de DNA, tampão da enzima e água. Essa solução foi suavemente homogeneizada e incubada por 3 horas a 4 °C. Foi adicionado 1/3 do volume de enzima previsto e a reação foi colocada em banho a 37 °C. Após 1 hora de incubação, o restante do volume de enzima foi adicionado e a reação continuou por aproximadamente 16 horas.

Alguns sistemas foram precipitados e ressuspensos em volume apropriado para serem aplicados no gel de agarose. Para tal, adicionou-se 0,5 V de acetato de amônio 7,5 M (concentração final de 2,5 M) e 2,5 V de etanol 100%. O sistema foi colocado em freezer a -80 °C por 2 horas, e após esse período foi centrifugado a 12.000 x g por 30 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% por 5 minutos a 12.000 x g e secado a temperatura ambiente. O DNA resultante foi ressuspensado em volume adequado de água. As amostras a serem aplicadas no gel foram acrescidas de tampão de amostra.

Os fragmentos de DNA digerido foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,9% em TAE 1 X contendo brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/mL de gel. A corrida foi realizada com mesmo tampão TAE 1 X, usando-se cerca de 2 V/cm

da cuba. Após a corrida, o gel foi tratado com solução de depuração por 10 minutos, solução de desnaturação por 30 minutos e solução de neutralização por 30 minutos. Entre os tratamentos, o gel foi lavado com água destilada. Em seguida foi montado o sistema para transferência por capilaridade. Usou-se membrana Hybond-N (Amersham Biosciences) e tampão de transferência SSC 10 X. Após transferência, por aproximadamente 18 horas, o material foi fixado à membrana em forno a 80 °C por 2 horas.

A sonda foi marcada com o kit “AlkPhos Direct labelling and detection system” (Amersham Biosciences - GE Healthcare) para geração de sinal quimioluminescente. O DNA usado como sonda foi diluído para uma concentração final de 10 ng/μL e utilizou-se 10 ng de DNA para cada mL de solução de hibridização. O volume adequado de sonda foi desnaturado por 5 minutos a 100 °C e imediatamente colocado no gelo. Acrescentou-se ao volume de sonda mesma quantidade de tampão de reação (“reaction buffer”), 1/5 do volume de reagente de marcação (“labelling reagent”) e igual volume de crosslinker (“crosslinker solution”) diluído 1:5. A reação ficou no banho a 37 °C por 30 minutos, conforme indicação do fabricante.

A solução de hibridização foi pré-aquecida a 55 °C e colocada junto com a membrana em garrafa no forno giratório a 55 °C. A pré-hibridização durou pelo menos 15 minutos. Em seguida, a sonda marcada foi adicionada à garrafa com o cuidado de não colocá-la diretamente sobre a membrana. A etapa de hibridização durou aproximadamente 16 horas a 55 °C.

Após essa etapa, a solução de hibridização foi retirada e acrescentou-se a solução para primeira lavagem pré-aquecida a 55 °C num volume de aproximadamente 2 mL/cm<sup>2</sup> de membrana. Foram feitas duas lavagens com essa solução a 55 °C com duração de 10 minutos cada. Seguiram-se duas lavagens com solução de segunda lavagem a temperatura ambiente com duração de 5 minutos cada.

Após as lavagens, o excesso de solução foi escorrido e a membrana foi colocada sobre filme PVC. Aplicou-se o reagente de detecção “CDP-*Star*” (Amersham Biosciences - GE Healthcare) ao longo da membrana, usando-se o volume de 30 μL/cm<sup>2</sup> de membrana. A reação ocorreu por 5 minutos e depois o excesso de reagente de detecção foi drenado. A membrana foi coberta com filme PVC e transferida para um cassete de exposição, no qual a mesma ficou em contato com filme autoradiográfico (Hyperfilm™ ECL™ - Amersham

Biosciences GE Healthcare) próprio para detecção de sinal quimioluminescente. Após 12 horas de exposição, o filme foi revelado com solução D-76 (Kodak), bloqueador e solução fixadora (Kodak).

#### **4.2.10. Northern blot**

O RNA total foi quantificado no “GeneQuant™*pro*” (GE Healthcare) e 15 µg de RNA foram usados por amostra. Adicionou-se tampão de amostra desnaturante na quantidade 5 (cinco) vezes maior que o volume inicial. As amostras foram aquecidas por 15 minutos em banho a 65 °C, imediatamente transferidas para o gelo e adicionado 1 µL de brometo de etídio 1 mg/mL e então foram aplicadas no gel desnaturante.

A agarose foi dissolvida em água no forno de microondas. O formaldeído e o MOPS foram acrescentados depois que a solução diminuiu a temperatura. O gel foi preparado e montado em condições livres de contaminação com RNase.

A corrida se deu com tampão MOPS 1 X, por aproximadamente 3 horas, usando-se 5 V/cm. Após a corrida o gel foi tratado duas vezes com SSPE 10 X, por 30 minutos cada tratamento. Em seguida foi montado o sistema para transferência por capilaridade. Usou-se membrana Hybond-N (Amersham Biosciences) e tampão de transferência SSPE 10 X. Após a transferência por aproximadamente 18 horas, o material foi fixado à membrana em forno a 80 °C por 2 horas.

O fragmento de DNA usado como sonda foi marcado com material radioativo (<sup>32</sup>P) utilizando-se o kit “Random primers DNA labeling system” (Invitrogen). Em cada reação foram usados 33 ng de DNA, contidos em 24 µL de água,. Essa quantidade de sonda foi fervida por 5 minutos, imediatamente transferida para o gelo, e foram acrescentados: 2 µL de dTTP, 2 µL de dCTP, 2 µL de dGTP, 15 µL de “random primers”, 4 µL α-<sup>32</sup>P-dATP (aproximadamente 40 µCi), 1 µL da enzima klenow. A reação permaneceu em banho a 25 °C por 3 horas e ao fim desse tempo adicionou-se 5 µL de tampão de parada (stop buffer). A sonda foi purificada para retirada de nucleotídeos radioativos não-incorporados e para tal, foram usadas colunas S-400 (“MicroSpin Columns” – Amersham Biosciences). Imediatamente antes do uso a resina foi ressuspensa com uso de vortex, colocada em tubo de 1,5 mL e centrifugada a 735 x g por 1 minuto. A coluna foi colocada em novo tubo de 1,5 mL, a reação de marcação foi adicionada no centro da coluna e centrifugada a 735 x g por 2 minutos.

Após a marcação radioativa e purificação, a sonda foi quantificada em cintilador. O volume de 1  $\mu$ L da sonda foi colocado em um pequeno pedaço de papel de filtro e transferido para frasco contendo 2 mL de solução cintiladora este frasco foi colocado no cintilador e a amostra foi medida de acordo com o protocolo 4 do equipamento.

A membrana foi colocada em garrafa junto com a solução de pré-hibridização em forno giratório a 42 °C por 2 horas. Ao final desse tempo, a solução foi descartada e colocou-se a solução de hibridização e a sonda. Antes de adicionada, a sonda foi fervida por 5 minutos. A etapa de hibridização durou aproximadamente 16 horas.

Após essa etapa, a membrana foi lavada por 40 minutos a 65 °C com solução SSPE 2 X e SDS 1%. Essa etapa foi monitorada com contador Geiger, e quando necessário, outras lavagens foram feitas com a mesma solução mas alterando-se o tempo de lavagem.

Após a lavagem, a membrana foi coberta com filme PVC e colocada num cassete de exposição em contato com uma tela especial (Storage Phosphor – Amersham Biosciences) capaz de armazenar o sinal radioativo. A exposição durou cerca de 24 horas. A imagem foi digitalizada no “Typhoon 9210” (Ge Healthcare), com os parâmetros melhor sensibilidade, 100 e 200 microns.

Depois de digitalizadas, as imagens foram analisadas com o auxílio do programa “ImageQuant<sup>®</sup>” (Molecular Dynamics). Cada uma das bandas da membrana e do gel de RNA desnaturante que foi usado para transferência foi quantificada de acordo com sua intensidade. A área de cada banda a ser medida foi igual, pois o programa permite a seleção da área através de um grid e a ferramenta “corrigir background” (“histogram pick”) foi utilizada para que os valores de intensidade das bandas fossem corrigidos em relação ao fundo. Os valores dados pelo programa, tanto do gel quanto da membrana, foram plotados e comparados entre si. Para cada conjunto de valores, gel ou membrana, foi feita a comparação em relação a um controle (no choque térmico, o ponto inicial 0 minuto e na transição dimórfica, o ponto M). Na comparação, atribuiu-se ao controle 100% e avaliou-se qual a porcentagem a mais ou a menos em relação ao controle. Os dados foram normalizados dividindo-se os valores atribuídos às bandas das membranas pelos valores atribuídos às bandas dos géis, tendo-se, portanto, uma comparação entre a quantidade inicial presente no gel e sinal de hibridização na membrana.

#### **4.2.11. Preparo do extrato protéico**

As células que haviam sido congeladas após o choque térmico, foram colocadas em tubo “ependorf” contendo pérolas de vidro e tampão Tris-Cálcio (20 mM de Tris-HCl, pH 8,8 e 2 mM de CaCl<sub>2</sub>), contendo 0,05 mg/ml de TLCK (*N*- $\alpha$ -*p*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone); 4 mM de PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride), 5 mM de iodoacetamida, 1 mM de EDTA, 20  $\mu$ g/ml de leupeptina (Cunha *et al.*, 1999). A proporção usada foi de 1 g de levedura para 1 ml de tampão Tris-Cálcio. As células foram submetidas à agitação forte (uso de vortex) por 40 min, alternando-se durante esse tempo, ciclos de 30 segundos no vortex e 30 segundos no gelo. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 12000 x g a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo ependorf e a amostra foi novamente centrifugada a 12000 x g a 4° C por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e usado para as medidas de atividade enzimática.

#### **4.2.12. Quantificação de proteínas**

A concentração de proteínas solúveis totais foi medida nos extratos protéicos através do método de BCA (BCA Protein Assay Kit - Pierce), utilizando a albumina sérica bovina (BSA) para fazer a curva padrão.

#### **4.2.13. Medida das atividades enzimáticas**

##### **— superóxido dismutase (SOD)**

A atividade específica da SOD foi determinada pelo acompanhamento da oxidação do NADH a 340nm (Paoletti *et al.*, 1986). Na ausência da SOD, o sistema Mn-EDTA/mercaptoetanol/O<sub>2</sub> atmosférico gera O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, que oxida o NADH. Na presença da SOD, o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> é removido do sistema e a velocidade de oxidação do NADH é reduzida. Nas reações contendo o extrato protéico foram utilizadas as concentrações finais de: 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,2), 0,25 mM de NADH, 4 mM de MnCl<sub>2</sub>, 8 mM de EDTA, 4 mM de mercaptoetanol. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a velocidade de oxidação de 0,25 mM de NADH (Paoletti *et al.*, 1986).

##### **— citocromo c peroxidase (CCP)**

A atividade específica da CCP foi medida pelo acompanhamento da oxidação do citocromo c reduzido a 550nm. Nas reações enzimáticas contendo o extrato protéico foram utilizadas as concentrações finais de: 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,8), 0,1

mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,7 mg/mL de citocromo c reduzido. Foi adotado o coeficiente de extinção molar do citocromo c reduzido de 19,6 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Uma unidade de CCP é definida como a quantidade de enzima que oxida 1 mmol de citocromo c por minuto (Shechter *et al.*, 1983).

#### **4.2.14. Análise estatística dos dados**

A análise estatística dos dados foi feita utilizando o programa Minova versão 1.3 (Brooks, 1992). O teste utilizado foi o teste-t “normal student t test” para comparação de médias.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O projeto “Genoma funcional e diferencial do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*” (Felipe *et al.*, 2003 e Felipe *et al.*, 2005) objetivou o sequenciamento e identificação de genes transcritos nas fases de micélio e levedura. Esse tipo de abordagem permite a comparação do perfil transcricional nas duas fases e busca fundamentalmente o entendimento, em nível molecular, do processo de diferenciação celular o que pode proporcionar uma melhor compreensão da patobiologia do fungo.

A análise do transcriptoma do fungo *P. brasiliensis* revelou que este patógeno possui diversos representantes do sistema antioxidante, habilitando-o a combater as espécies reativas de oxigênio (Tabela 2). Como o *P. brasiliensis* é uma parasita intracelular, o sucesso da colonização dos tecidos do hospedeiro é dependente da resistência do fungo aos mecanismos microbicidas e microbiostáticos do hospedeiro (Campos *et al.*, 2005), nos quais um dos principais mecanismos envolvido é o de resistência ao estresse oxidativo. A tabela reúne 33 PbAEST (“*P. brasiliensis* assembled expressed sequence tag”) que correspondem a genes expressos no *P. brasiliensis* que codificam para: 1) enzimas antioxidantes; 2) enzimas envolvidas na biossíntese e metabolismo da glutatona e regeneração do NADPH; 3) proteínas relacionadas a homeostase de íons metálicos e 4) fatores transcricionais referentes à resposta ao estresse oxidativo.

**Tabela 2. Genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo identificados no transcriptoma do *P. brasiliensis*.**

PbAEST	Anotação	Número de EST		Organismo/ n. acesso/ valor e	Referência
		M	L		
<b>Enzimas antioxidantes</b>					
1649	MnSOD ( <i>sod2</i> )	19	9	<i>Emericella nidulans</i> / AAF66995.1/ 6e-87	Felipe <i>et. al.</i> , 2005
2509	CuZnSOD ( <i>sod1</i> )	14	5	<i>Aspergillus fumigatus</i> / AAD42060.1/ 1e-68	Felipe <i>et. al.</i> , 2005
50	CuZnSOD GPI-ancorada ( <i>sod3</i> )	0	8	<i>C. albicans</i> / XP_719631.1/3e-16	Castro <i>et al.</i> , 2005
621	Catalase P ( <i>cat P</i> )	6	5	<i>P. brasiliensis</i> / AAL34518.2/ 0.0	Moreira <i>et al.</i> , 2004
3142	CatalaseA ( <i>cat A</i> )	0	1	<i>P. brasiliensis</i> / AAR87484.1/ 3e-75	Felipe <i>et. al.</i> , 2005
3183	Citocromo c peroxidase ( <i>ccp</i> )	0	1	<i>A. fumigatus</i> / Q4NPF8/ 2e-30	Felipe <i>et. al.</i> , 2005

1715	Peroxiredoxina da família AhpC-TSA (Ahp1p)	2	6	<i>P. brasiliensis/</i> AAQ84041.1/ 4e-90	Felipe <i>et. al.</i> , 2005
1811	Peroxiredoxina (Pmp20)	0	4	<i>Homo sapiens/</i> AAF04856.1/ 5e-12	Felipe <i>et. al.</i> , 2005
190	Proteína antioxidante tiol específica ( <i>tsa1</i> )	2	5	<i>Ajellomyces capsulatus/</i> AAG31645.1/ 3e-96	Felipe <i>et. al.</i> , 2005
1923	Tioredoxina ( <i>trx</i> )	6	7	<i>P. brasiliensis/</i> AAQ84040.1/ 7e-49	Felipe <i>et. al.</i> , 2005
5873	Tioredoxina redutase ( <i>trxB</i> )	1	0	<i>Schizosaccharomyces pombe/</i> Q92375/ 9e-23	Campos <i>et. al.</i> , 2005
1333	Subfamília de glutaredoxina relacionada a GRX4 e GRX5	2	2	<i>S. cerevisiae/</i> NC_001136/ 2e-42	Campos <i>et. al.</i> , 2005
<b>Metabolismo da glutatona e regeneração de NADPH</b>					
1485	$\gamma$ -glutamil cisteína sintetase	1	1	<i>A. fumigatus/</i> XP_754234.1/ 5e-42	Campos <i>et. al.</i> , 2005
5388	$\gamma$ -glutamil cisteína sintetase	1	0	<i>Neurospora crassa/</i> Q8X0X0/ 1e-66	Campos <i>et. al.</i> , 2005
2805	$\gamma$ -glutamil cisteína sintetase	0	1	<i>A. fumigatus/</i> XP_754234.1/ 3e-28	Campos <i>et. al.</i> , 2005
1446	Glutaciona sintetase	1	1	<i>A. fumigatus/</i> XP_753972.1/ 4e-75	Campos <i>et. al.</i> , 2005
1304	Glutaciona redutase ( <i>gr1</i> )	2	0	<i>A. fumigatus/</i> XP_752962.1/ 3e-123	Felipe <i>et. al.</i> , 2005
5013	Glutaciona s transferase	0	1	<i>N. crassa/</i> EAA32170.1/ 2e-21	Felipe <i>et. al.</i> , 2005
2597	Glutaciona s transferase, classe omega	0	2	<i>Vibrio vulnificus/</i> AAO11401.1/ 1e-28	Felipe <i>et. al.</i> , 2005
2296	Glutacione s transferase	1	1	<i>Nostoc punctiforme/</i> P_00109643.1/ 4e-23	Felipe <i>et. al.</i> , 2005
832	Glutaciona s transferase	1	7	<i>S. pombe/</i> CAA22828.1/ 7e-42	Felipe <i>et. al.</i> , 2005
5023	Glicose-6-fosfato desidrogenase	0	1	<i>Aspergillus nidulans/</i> XP_660585.1/ 2e-38	Campos <i>et. al.</i> , 2005
553	6-fosfogluconato desidrogenase	6	8	<i>Coccidioides immitis/</i> EAS35799.1/ 0.0	Campos <i>et. al.</i> , 2005
<b>Homeostase de íons metálicos</b>					
858	Frataxina	0	4	<i>S. cerevisiae/</i> NP_010163.1/ 3e-15	Campos <i>et. al.</i> , 2005
2607	Atx1p	3	0	<i>S. cerevisiae/</i> NP_014140.1/ 1e-09	Campos <i>et. al.</i> , 2005
541	Lys7p	2	4	<i>S. cerevisiae/</i> NP_013752.1/ 5e-51	Campos <i>et. al.</i> , 2005
<b>Fatores transcricionais</b>					
1731	Yap1p	1	3	<i>N. crassa/</i> CAB91681.2/ 4e-16	Campos <i>et. al.</i> , 2005
4548	Yap3p	0	1	<i>S. cerevisiae/</i> NP_011854.1/ 8.1e-08	Campos <i>et. al.</i> , 2005
2533	Skn7p	1	1	<i>S. pombe/</i> O14283/ 5e-26	Campos <i>et. al.</i> , 2005
0356	Hog1	0	2	<i>Magnaporthe grisea/</i> AF184980_1/ 1e-73	Felipe <i>et. al.</i> , 2005
3937	regulador dependente de Mac1 (Mdr1p)	1	0	<i>S. cerevisiae/</i> NP_011614.1/ 3e-31	Campos <i>et. al.</i> , 2005
1426	Hap3p (HAPC)	2	1	<i>Aspergillus oryzae/</i> BAA28356.1/ 2e-64	Campos <i>et. al.</i> , 2005
3390	ativador transcricional (Hap)	0	1	<i>A. nidulans/</i> AB052971/ 1e-29	Campos <i>et. al.</i> , 2005

Entre as PbAESTs relacionadas na tabela acima, foram encontradas as seqüências de cDNA que codificam para as enzimas superóxido dismutase mitocondrial (*sod2*) e citoplasmática (*sod1*), que detoxificam o radical superóxido. Estas seqüências estão completas e foram caracterizadas anteriormente (Dantas, 2005). Entre as enzimas que detoxificam o peróxido de hidrogênio, estão presentes no transcriptoma do *P. brasiliensis* as catalases peroxissomal (*catP*) e citoplasmática (*catA*). As peroxiredoxinas, glutaredoxinas e tioredoxinas são enzimas responsáveis pela detoxificação de uma grande variedade de produtos da oxidação de compostos orgânicos e peróxido de hidrogênio. As peroxiredoxinas diferem de outras peroxidases por não possuírem co-fatores, como metal ou grupo prostético nas reações de oxidorredução por elas catalisadas (Wood *et al.*, 2003). As tioredoxinas são proteínas de baixa massa molecular (~12 kDa) que contém em seu sítio ativo grupamentos SH, que participam da transferência de elétrons pela oxidação reversível desse grupo, originando pontes dissulfeto (-S-S-). Compõem ainda o sistema antioxidante da tioredoxina, a tioredoxina redutase (que converte a tioredoxina oxidada em reduzida, tendo o NADPH como doador de elétrons) e a peroxidase dependente de tioredoxina. As glutaredoxinas pertencem à superfamília das tioredoxinas, são proteínas pequenas e termoestáveis com atividade oxidorredutase. Proteínas destas classes estão representadas no transcriptoma do *P. brasiliensis*, como as peroxiredoxinas, Tsa1, Ahp1p e Pmp20; a glutaredoxina (PbAEST 1333); a tioredoxina (PbAEST 1923) e a tioredoxina redutase (PbAEST 5873).

Na segunda categoria mostrada na tabela 2, estão relacionadas as enzimas envolvidas na biossíntese e metabolismo da glutathiona e regeneração do NADPH. A glutathiona é um tripeptídeo ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinilglicina) e um dos principais antioxidantes presentes na célula pois ela mantém o meio intracelular mais reduzido e participa do metabolismo de xenobióticos e espécies reativas de oxigênio (Sigler *et al.*, 1999). A biossíntese da glutathiona ocorre em duas etapas: os aminoácidos glutamato e cisteína são combinados pela ação da  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetase (também conhecida por glutamato-cisteína ligase), sendo a disponibilidade de cisteína um fator limitante da reação; a  $\gamma$ -glutamil cisteína é combinada a glicina pela ação da glutathiona sintetase. A oxidação da glutathiona é mediada pela enzima glutathiona peroxidase (GPx), e sua forma oxidada (GSSG) é convertida para a forma reduzida pela glutathiona redutase, que utiliza o NADPH como doador de elétrons. O NADP<sup>+</sup> é regenerado a NADPH através da ação das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase. A exceção da glutathiona

peroxidase, todos os outros genes que codificam para as enzimas relacionadas a biossíntese e metabolismo da glutatona, bem como aqueles que participam da regeneração do NADPH, foram encontradas no transcriptoma do *P. brasiliensis*. As enzimas glutatona s transferases (GST) catalisam a reação de conjugação da glutatona a vários compostos hidrofóbicos, através da formação de uma ligação tioéter entre eles. Estas enzimas estão relacionadas à proteção da célula contra xenobióticos e sub-produtos do metabolismo oxidativo, como os hidroperóxidos lipídicos, uma vez que conjugados a glutatona esse compostos atravessam a membrana plasmática, através de transporte ativo (Grant, 2001). Existem oito classes de glutatona s transferases que diferem na região que se liga ao substrato hidrofóbico e conseqüentemente apresentam afinidade diferente pelos diversos substratos. Estas enzimas também estão representadas no transcriptoma do fungo.

Na tabela 2, estão presentes na terceira categoria, as proteínas relacionadas à homeostase de íons metálicos. Os íons  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+2}$  são necessários para diversos processos celulares como transporte, proteção contra danos oxidativos, crescimento celular entre outros. Entretanto, eles podem gerar radical hidroxil através da reação de Fenton, por isso seus níveis celulares devem ser controlados. Algumas das importantes proteínas que participam da homeostase desses íons no interior da célula estão presentes no transcriptoma do *P. brasiliensis*. A frataxina está relacionada com o controle dos níveis intracelulares de ferro, postula-se que essa proteína funcione tanto como uma chaperona de  $\text{Fe}^{2+}$  quanto como uma molécula capaz de acumular  $\text{Fe}^{3+}$ , quando este se encontra em excesso. Em *S. cerevisiae* a perda dessa proteína causa acúmulo de ferro na mitocôndria, retardando a respiração e causando dano oxidativo à mitocôndria e ao DNA (Wilson & Roof, 1997; Karthikeyan *et al.*, 2002). Outras duas metalochaperonas foram identificadas no transcriptoma do *P. brasiliensis*: a Lys7p que é uma chaperona de cobre que especificamente entrega este íon para a CuZnSOD intracelular no citoplasma e Atx1p que leva o íon cobre para Ccc2p, uma proteína transportadora de cobre que por sua vez, leva este íon às vias secretórias a fim de que ele seja incorporado às enzimas que necessitam de cobre.

A quarta categoria da tabela 2 refere-se aos fatores transcricionais referentes à resposta ao estresse oxidativo. O fator transcricional Yap1p trafega entre o citoplasma e o núcleo da célula e, em resposta ao estresse oxidativo ele vai para o núcleo e se liga a regiões específicas do DNA denominada YRE (“Yap response element”). Skn7 regula a transcrição de alguns genes, de forma independente da via HOG MAPK. O fator

transcricional Hog1 da via HOG MAPK está presente no transcriptoma, mas outras proteínas que fazem parte desta via de sinalização não foram detectados. Mac1 é um fator transcricional relacionado à ativação de genes relacionados a homeostase do íon cobre, ele também está presente no transcriptoma do fungo. Msn2/Msn4 são fatores transcricionais que se ligam no DNA às seqüências conhecidas por STRE (“stress response element”), não foram encontradas no transcriptoma do *P. brasiliensis*, estando estas proteínas ausentes também em *C. albicans* (Enjalbert *et al.*, 2003).

Neste trabalho, os genes estudados foram originados do projeto supracitado e codificam para enzimas superóxido dismutase GPI-ancorada e citocromo c peroxidase, potencialmente relacionadas com a defesa do fungo contra o estresse oxidativo. A partir dos dados gerados e depositados em banco de dados (<https://www.biomol.unb.br/Pb>), as seqüências de interesse foram caracterizadas e analisadas.

## **5.1 Caracterização molecular dos cDNAs que codificam para as enzimas PbSOD3 e PbCCP**

### **5.1.1. Superóxido dismutase GPI-ancorada**

A seqüência do cDNA que codifica para a provável enzima CuZn superóxido dismutase GPI-ancorada, PbSOD3, está presente no banco de dados do transcriptoma do fungo *P. brasiliensis* e foi depositada no GenBank<sup>®</sup> sob o número de acesso DQ832188. Em uma primeira análise, esta seqüência foi citada como uma proteína GPI-ancorada por Castro e colaboradores (2005), a qual corresponde ao contig 50 que é composto por 8 ESTs originadas da fase leveduriforme. A seqüência de aminoácidos da enzima putativa PbSOD3 possui 228 aminoácidos, com um ponto isoelétrico (pI) estimado de 6,05 e uma massa molecular de 24,3 kDa, valores próximos daqueles preditos para a Sod5 de *C. albicans*, cuja massa molecular é estimada em 23,6 kDa e o pI é de 6,37. Estes valores preditos de massa molecular dessas proteínas são próximos do valor de 30 kDa da subunidade formadora do tetrâmero na EC-SOD humana (Oury *et al.*, 1996). A seqüência deduzida de aminoácidos da PbSOD3 apresenta a assinatura característica da família CuZnSOD, um peptídeo sinal na porção N-terminal e uma região de ancoragem ao GPI (Figura 2).

1 *tggtacttccactcgcggttagcttctgcttcgaggatactaccctgtgatttctatt*  
61 *tctgttacatagcattcaaaacccgccacaagttaagccacactacattatcacaaaagg*  
121 *catacactatataatagcctttaccgggttgcttgacacgattttctttttttcttttcg*  
1 M K P T F S I L A C S L G F A L R A T A  
181 *acATGAAGCCTACATTTTCTATCCTCGCCTGTTTCGCTGGGCTTTGCCCTCCGTGCGACTG*  
21 Q V M M E A V T T E N N P M N A M Y Q M  
241 *CGCAAGTTATGATGGAAGCCGTCACTACTGAAAACAACCCATGAATGCTATGTACCAGA*  
41 K L M D R N D T T V R G I V N I T S G P  
301 *TGAAGCTGATGGACAGAAATGACACCACTGTTTCGCGGAATTGTCAATATTACTAGTGGCC*  
61 G G L G V M Y S C R F W G F P N E T E N  
361 *CAGGCGGCTTAGGCGTGATGTACAGCTGCAGATTTTGGGGTTTCCCAAACGAGACAGAAA*  
81 G P F P W H V H D Q P V S S D G N C N S  
421 *ATGGACCCTTCCCGTGGCACGTCATGATCAACCTGTTCAGTTCGACGGAACGCAACA*  
101 T L A H L D L I D R G E F P P C N A S N  
481 *GCACCCTTGCCCATCTCGATCTAATAGATCGTGGCGAATTTCCACCCTGCAACGCGAGCA*  
121 P K T C Q E G D M S G K Y G N I T N A S  
541 *ATCCCAAGACGTGCCAGGAGGTGATATGAGTGGCAAGTACGGCAACATTACGAACGCGT*  
141 G G N V Y E V T F I D N F T S L T D G L  
601 *CCGGCGGGAACGTCTATGAAGTGACTTTTATCGATAATTTACCTCCCTCACAGATGGCT*  
161 G A F V G N R S M V V H Y R N S S R I N  
661 *TGGGTGCATTCGTCGGCAATCGATCTATGGTTCGTCATTACAGGAATTCGAGCCGTATCA*  
181 C G N I T L A S I N G T A V P T P S A S  
721 *ACTGCGGCAACATTACGCTAGCCAGCATAAATGGTACTGCTGTCCCACGCCAAGTGCAT*  
201 Q R P S Q G P A N R V G A F G L G V M L  
781 *CACAACGACCCTCCCAAGGCCCTGCAAATCGTGTGGTGCCTTCGGTCTTGGCGTGATGC*  
221 A G V A A M I W \*  
841 *TGGCCGGTGTGCTGCGATGATATGGTAAagagctatggtgggagattttatgcaatggt*  
901 *tgggataagcttcgatgagatgattataaaaagggccgggtttgtacacttcggaat*  
961 *ggttttcgatatcgtttctccaccctcaacttttgggcttatcactttttgtctttggtc*  
1021 *acattttatgctaatttcacaagatttcactgggtggaatctcaggggatatactccat*  
1081 *gtatacttattagtcctcatccgtcccctgcattgcactgaacttgtttgattgattt*  
1141 *ctgtctgtctgtcctttacttgatgctcaacaatattcgattctccttattcttttatt*  
1201 *ccttgtcttttttttttttcgctttaagcttgtttcctattttttatacgtaaatagtt*  
1261 *cagttagtaacggttgatgaaaagttaattttttt*

**Figura 2. Sequência de nucleotídeos e de resíduos de aminoácidos deduzidos da PbSOD3.** A sequência protéica evidencia a assinatura da CuZnSOD (em caixa), o peptídeo sinal (sublinhado) e região de ancoragem ao GPI (sublinhado duplo). A predição de peptídeo sinal foi feita por meio do programa SignalP 3.0 e a região de ancoragem ao GPI com o programa DGPI, detecção automática de proteína ancorada em GPI ([http://129.194.185/dgpi/index\\_en.html](http://129.194.185/dgpi/index_en.html)).

A família CuZnSOD possui a assinatura [GA]-[IMFAT]-H-[LIVF]-H-x(2)-[GP]-[SDG]-x-[STAGDE], onde os resíduos HVH (posições 86, 87 e 88 da PbSOD3 – ver figura 3) participam do sítio ativo da enzima, tendo papel na ligação de coordenação do íon  $\text{Cu}^{2+}$ , essencial para sua atividade catalítica. A análise no programa PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp>) que faz predição da localização celular a partir da seqüência de aminoácidos indica que a PbSOD3 deve ser uma enzima extracelular e que a possibilidade desta enzima estar localizada na parede celular é de 34,8% e/ou também na membrana celular o valor é o mesmo de 34,8%. Portanto, como neste trabalho não foram realizados experimentos que pudessem comprovar sua localização celular, até o momento não podemos afirmar qual é a localização precisa desta enzima. Entretanto, todas as análises *in silico* desta seqüência sugerem fortemente que esta enzima de *P. brasiliensis* esteja presente nos compartimentos de membrana/parede e/ou no meio extracelular. A mesma análise (PSORTII) com a Sod5 de *C. albicans* mostra que ela tem 55,6% de possibilidade de ser extracelular e 44,45% de estar presente na membrana plasmática. Fradin e colaboradores (2005) confirmaram que a Sod5 é uma proteína GPI-ancorada localizada na parede celular. Nesse estudo, eles analisaram células de *C. albicans* contendo uma proteína Sod5 fusionada a GFP que foi detectada por imunolocalização, microscopia imunoeletrônica e microscopia de fluorescência. Adicionalmente, os extratos contendo a parede celular foram tratados com HF-piridina, que cliva especificamente proteínas GPI-ancoradas ligadas às cadeias de  $\beta$ -1,3 glucana e analisados por espectrometria de massa. Estes experimentos confirmaram a predição *in silico* de que a Sod5 é uma proteína extracelular, ancorada à parede celular. Portanto, a caracterização da região de ancoragem ao GPI na porção C-terminal é determinante para a classificação da PbSOD3 como um tipo distinto das enzimas CuZnSOD intracelulares. Experimentos similares deverão ser realizados visando determinar a localização celular da SOD3 de *P. brasiliensis*.

A seqüência protéica da SOD3 de *P. brasiliensis* foi alinhada com as seqüências Sod4 e Sod5 de *C. albicans*, pois são as enzimas de fungo descritas com atividade superóxido dismutase no meio extracelular (Figura 3). A análise de identidade e similaridade entre estas seqüências ([http://bioinformatics.org/sms2/ident\\_sim.htm](http://bioinformatics.org/sms2/ident_sim.htm)) mostra que entre PbSOD3 e Sod4 há 23,72% de identidade e 40,32% de similaridade, muito semelhante aos resultados obtidos entre PbSOD3 e Sod5, que apresentam 24,10% de identidade e 38,55% de similaridade. Embora estas similaridades/identidades não sejam altas é importante ressaltar que a definição de uma seqüência CuZnSOD codificar para

uma enzima extracelular depende da presença dos 2 (dois) domínios (assinaturas moleculares) descritos, os quais estão presentes na seqüência da PbSOD3.

```

Sod4      -----MKYLSIIISIVALALAGDSPISTDSKGGKAPLVARFKKTSKSDIEGTIKFEPAN 52
Sod5      -----MKYLSIFLLATFALAGDAPISTDSKGGSPSLIAKFEKTSKSNIEGTIKFTPAN 52
PbSOD3    MKPTFSILACSLGFALRATAQVMMEAVTTENNPMNAMYQMKLMDRNDTTVRGIVNITSGP 60
           *.: .: : :: :.: . . . :.: . . .: :.* :.: .

Sod4      NGT-VLVSVDLTGLP--SGVGPYPYHVHEKPVPESKNCTATGMHFNPFNG----STTAKT 105
Sod5      NGT-VSVSVDLKGLP--SDIGPFYPYHVHEKVPVASKNCSATENHFNPNYNG----TVRAAT 105
PbSOD3    GGLGVMYSCRFWGFPNETENGGPFPWHVHDQPVSSDGNCNSTLAHLDLIDRGEFPPCNASN 120
           . * * * : ** : **:*:***:***. . **.:* **: : . * .

Sod4      PAALELGDLSGRHGNITSES----FEVEYDDSYISLNKDSKAYIGGLSIVVHSNNNTRLN 161
Sod5      PAAHEVGDLAGKHGNIMGES----YKTEYDDSYISLNEKSRSYIGGLSIVIHANNTRLN 161
PbSOD3    PKTCQEGDMSGKYGNITNASGGNVYEVTFIDNFTSLTDGLGAFVGNRSMVVHYRNSSRIN 180
           * : : **:*:***:*** . * :.: : *.: **.. :.:* .***:*.*:***

Sod4      CANITTLDEGDDTASAATWSNSSSSSSSSSSKSNSTNGSSGSSTASQSGAGRAEISGFLA 221
Sod5      CANITLLDEGHGNAN-TTMSNSSSSSSSQS---AVNTSSSMASAPQNGAERAVVNGLLA 217
PbSOD3    CGNITLAS-----INGTAVPTPSASQRPSSQGPANRVGAFG 215
           *.*** . * :.: :.:*.* . * * :.

Sod4      AGIAGVVAALI-- 232
Sod5      AGVVGVI AALI-- 228
PbSOD3    LGVMLAGVAAMIW 228
           *: . .* :

```

**Figura 3. Alinhamento entre as seqüências Sod4 e Sod5 de *C. albicans* e a provável superóxido dismutase GPI-ancorada de *P. brasiliensis* (PbSOD3).** As regiões que representam a assinatura da CuZnSOD e a região de ancoragem ao GPI estão sombreadas. As seqüências protéicas de Sod4 e Sod5 de *C. albicans* foram obtidas em <http://www.candidagenome.org> (orfs 19.2062 e 19.2060, respectivamente). O alinhamento das seqüências foi feito com auxílio do programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). “\*” indica que o mesmo aminoácido está presente em todas as seqüências, “:” indica substituições conservadas, “.” indica substituições semi-conservadas.

Como a PbSOD3 contém um motivo CuZnSOD, que também está presente nas enzimas CuZnSOD intracelulares, foi realizada uma análise de identidade e similaridade entre as seqüências protéicas da PbSOD3 e as CuZnSOD intracelulares dos fungos *N. crassa*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *C. neoformans* var. *neoformans*, *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *P. brasiliensis*. O resultado desta análise mostra que a identidade varia de 15,8% a 17,5% e a similaridade, de 25,4% a 39,4% (Tabela 3).

**Tabela 3. Identidade e similaridade entre as seqüências PbSOD3 e CuZnSODs intracelulares dos fungos *N. crassa*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *C. neoformans var. neoformans*, *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *P. brasiliensis*.**

Organismo/ N° de acesso	Identidade(%)	Similaridade (%)
<i>Aspergillus nidulans</i> / AAL38992.1	15,79	33,33
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> / AAT99430.1	15,79	36,40
<i>Candida albicans</i> / AAC12872.1	16,23	25,44
<i>Neurospora crassa</i> / P07509	16,23	35,09
<i>Aspergillus fumigatus</i> / AAL38991.1	16,67	33,33
<i>Cryptococcus neoformans var. neoformans</i> / AAK31915.1	16,67	39,47
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> / AAX13803.1	17,54	27,19

Fonte: [http://bioinformatics.org/sms2/ident\\_sim.html](http://bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html)

Além destas seqüências não apresentarem os motivos e as assinaturas característicos da CuZnSOD extracelular, o mesmo tipo de análise entre as seqüências protéicas das enzimas CuZnSOD intracelulares de *C. albicans* e *P. brasiliensis* mostra que a identidade é de 74,03% e a similaridade, de 84,42%. Portanto, quando se compara a similaridade/identidade entre as seqüências de CuZnSOD intracelulares de vários organismos observam-se altos valores para estes parâmetros, o que reforça a nossa proposta da PbSOD3, uma vez que quando comparada com as seqüências intracelulares a mesma apresenta as médias de apenas 16,41% e 32,89% de identidade e similaridade, respectivamente. Sabe-se que as CuZnSOD intracelulares compartilham entre si grande identidade e similaridade, com pouca variação interespecífica.

### 5.1.2. Citocromo c peroxidase

A enzima citocromo c peroxidase (CCP) está representada no transcriptoma do fungo *P. brasiliensis* por apenas uma seqüência (singlet PBDEX-Y1-025t\_B08.esd) detectada na fase leveduriforme. Um dos motivos característicos desta proteína, denominado assinatura da proteína, foi encontrado na proteína putativa de *P. brasiliensis* originada da tradução *in silico* da seqüência parcial do cDNA do banco de EST. A região conservada do sítio ativo das peroxidases é representada por [SGATV]-{D}-x(2)-[LIVMA]-R-[LIVMA]-x-[FW]-H-{V}-[SAC] (Figura 4). A seqüência de aminoácidos da proteína putativa CCP de *P. brasiliensis* obtida foi parcial (194 aminoácidos), mas, foi

possível localizar o provável sítio ativo da enzima, região que apresenta maior identidade e similaridade com outras enzimas CCP de outros fungos.

```

1  tgaccatgattacgccaagctcgaattaacctcactaaagggaaacaaaagctggagctC
61  caccgcggtggcggccgctctagaactagtgatcccccggtgcaggaattcggcacg
121  aggctgacagtcattactctcgttatttttctcctatttcctctttccaaggcatcattt
1      M A S V A R T F
181  atctcctttttccttttgtttctgttccgtttttgaggATGGCTTCTGTGGCGAGAACTT
9   T R G F T R A S T A N S S S S I R Y S T
241  TCACTCGGGGTTTCACTCGCGCATCCACCGCAACTCCTCTTCGTTCGATCAGATATTCCA
29  R T S T R F V L P S Q A F C T G S R R G
301  CTCGCAC TTCAACTCGCTTTGTCCTCCCCCTCCAGGCCTTCTGTACCGGTCCCGCAGAG
49  Y A S G P E G E K S S R S F H I G L G A
361  GATATGCTTCTGGTCCTGAGGGTGAAAAGTCTTCTCGCAGCTTCCACATCGGATTGGGAG
69  V V I A G A G A L Y Y L N K D G P K A S
421  CTGTCGTCATTGCAGGTGCCGGTGCTCTCTACTACCTGAATAAAGATGGCCCCGAAAGCCA
89  T K P S G P F T P T K D D Y Q K V Y D E
481  GCACGAAACCTCAGGCCCTTACACCAACCAAGGATGATTACCAGAAAGTGTACGATG
109  I A R L L V E N D D Y D D G S Y G P V L
541  AAATTGCGAGACTCTTAGTTGAAAATGATGACTATGATGATGGTAGCTATGGACCGGTTT
129  I R L A W H A S G T Y D K E T G T G G S
601  TAATCCGATTGGCATGGCAGCAAGTGGTACTTATGATAAGGAACTGGAAC TGGAGGAA
149  N G A T M R F A P E S D H A A N A G L K
661  GCAATGGTGCCACCATGCGCTTCGCTCCTGAGAGTGACCACGCTGCCAACGCTGGTTTGA
169  A G E R R T R P T K W M E S P R V Y P Q
721  AAGCTGGCGAGAGAAGAAC TCGACCGACGAAATGGATGGAGAGCCCAAGAGTATACCCCC
189  N S G R H N *
781  AAAATTTCAGCCGCCATAATtaagtagaagattccagttactttaacaacaagtatataaac
841  ctagggatcccgcacacgtggacttttacaacgaacacaggttcagtgtgagcactcgtg
901  gcgaaataaaaagcatctttttgtactgttttagacaccaataagntaaaaatactgtgca
961  gttgtcagaggggaagatatatccccactttttatgacacacacatgcacagctaactaca
1021  ccgaacaaaaagtacccgaaacctagatcgggcccgttccaccaaaaagctatgctgca
1081  cagccctgtaaatgtacaaaattgggcaaacatggatagccgtataaatcaatagta
1141  aggttaagacatactgaacgattaaaagataatatgtaataaat ttagagatacagataa
1201  ttactatacaccacaatcaaagtgcgcgtagaacattggggagaaacatataccca

```

**Figura 4. Seqüência de nucleotídeos e de resíduos de aminoácidos deduzidos da PbCCP. Na seqüência protéica está destacado o sítio ativo da citocromo c peroxidase, em caixa.**

A seqüência de aminoácidos da provável CCP de *P. brasiliensis* (PbCCP) foi alinhada com as seqüências de CCP dos fungos *N. crassa*, *A. fumigatus*, *S. cerevisiae* e *C. neoformans*. Existe uma similaridade de 62 a 75% e identidade de 53 a 68% entre as seqüências, principalmente na região da PbCCP, compreendida entre o aminoácido 108 até o aminoácido 167 (Figura 5 e Tabela 4). A assinatura protéica característica da ligação ao ferro dessa enzima [DET]-[LIVMTA]-x(2)-[LIVM]-[LIVMSTAG]-[SAG]-[LIVMSTAG]-H-[STA]-[LIVMFY] está presente nas seqüências de aminoácidos das CCP dos outros fungos e não pode ser mostrada na seqüência deduzida da PbCCP porque ela é parcial.

Umaydis	----MASLRTGLRVAQPLR-ASARNFATRPSIRSSVRHYSSPAPGS-----PPPPQP	47
Cneoformans	-----MSFRAPNLIRSAAGRRASQTLNLRSQVIRRRFATEGG-----PEITKP	43
Afumigatus	-----MASAARSASR-AFLRSTPTTSSFRPAVRAARFALPAQGFRAAGRRGYASEA	50
PbCCP	MASVARTFTRGFTRASTANSSSSIRYSTRTSTRFVLP SQAFCTGSR-----RGYASGP	53
	. . . . . * :	
Umaydis	SSS-SSTSKVLLTSVAIAAAAGGAFLAFGRDDKVSILGVGANGANKFQSGKGSVGPATTS	106
Cneoformans	SSPRSSNTRYLLAGVGIAAVG-AAYFYFGTG--RTAHSANKADTVVRGAVATVEAKTGL	100
Afumigatus	NSGKSSSNVFLWAGLAVAGGAGAYLYLNGSD-----SVTSKTFV	89
PbCCP	EGEKSSRSFHI GLGAVVIAGAGALYYLNKDG-----PKASTKPSGPF	95
	.. ** . : . : . . . . . :	
Umaydis	AHSKADYQAVYNAIAEQLEANPDYDDGSYGPVLRVRLAWHASGTYDKNSNTGGSNATMRF	166
Cneoformans	RRGKDEYQKVYNR IAETLEKE-GYDDGSLAPVLRVRLAWHSSGTYNKEDGTGGSNFATMRF	159
Afumigatus	P-GKEDYQKVYDAIARRLADETDYDDGSYGPVLRVRLAWHASGTYDKETGTGGSNATMRF	148
PbCCP	TPTKDDYQKVYDEIARLLVENDDYDDGSYGPVLRVRLAWHASGTYDKETGTGGSNATMRF	155
	* : ** ** : ** . * : . ***** . ***** : ***** * : . ***** *****	
Umaydis	APSEHGANAGLGAARDFMEKIHQKFPWITYSDLWTLGGVAAIQELGGPKIPWRPGRKDA	226
Cneoformans	KPEAEHSANGLHVAREHMEKIKQEFPWISYGDLWTLGGVCAVQESGGPTIPWRPGRIDG	219
Afumigatus	APESDHGANAGLKIARDFLEPIKAQFPWISYSDLWTLGACAIQELGGPTIPWRPGRQDK	208
PbCCP	APESDHAANAGLKAG----ERRTRPTKWMESPRVY-----PQNSGRHN-	194
	** : * . ** ** . * * : : :	
Umaydis	TADKCTPDGRLPDGDKGPDHLRYIFYKMGFNDQ <b>EIVALS</b> GAHALGRCHTDRSGFDGPWTF	286
Cneoformans	FEAQVTPDGRLPDASQAQDHLRFIFNRMGFNDQ <b>EIVALS</b> GAHAMGRCHTNRSGFEGPWTF	279
Afumigatus	DVAACTPDGRLPDASKDQRHIRDIFYRMGFNDQ <b>EIVALI</b> GAHALGRAHPDRSGYDGPWDF	268
PbCCP	-----	
Umaydis	APTSFTNEYFNLLMNEKWNIRKWNNGPPQFEDKSTKSLMMLMTDMALVQDPSFKKHVQRYA	346
Cneoformans	SPVTFSNQYFALLRDEPWQKKWTGPAQYEDKNTKTLMMLPPTDMALLKDKSFKKYVDIYA	339
Afumigatus	SPTVFTNEFFRLLVDEKQNRKWNNGPAQFTDKTTKTLMMLPADLALIKDKEFKKHYERYA	328
PbCCP	-----	
Umaydis	KSEDEFFNDFRSAYAKLLELGVPAENFKAFETKLDGGKPFEFATSAEQENAN	398

```

Cneoformans      DNEEKFFSDFAKAFSKLIELGVPERQW-----AGEPWTLLGTSD----- 377
Afumigatus       RSDAFFKDFSDAFVKLLELGVPTSK-----AEDRYVFKTSE----- 366
PbCCP            -----

```

**Figura 5. Alinhamento das seqüências de aminoácidos da CCP de *P. brasiliensis* e dos fungos *Ustilago maydis*, *C. neoformans* e *A. fumigatus*.** O sítio ativo da peroxidase está sombreado e a assinatura protéica que determina a ligação ao ferro está em negrito. “\*” indica que o mesmo aminoácido está presente em todas as seqüências “:” indica substituições conservadas, “.” indica substituições semi-conservadas. <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>.

**Tabela 4. Identidade e similaridade entre as seqüências de CCP de *P. brasiliensis* e outros fungos.**

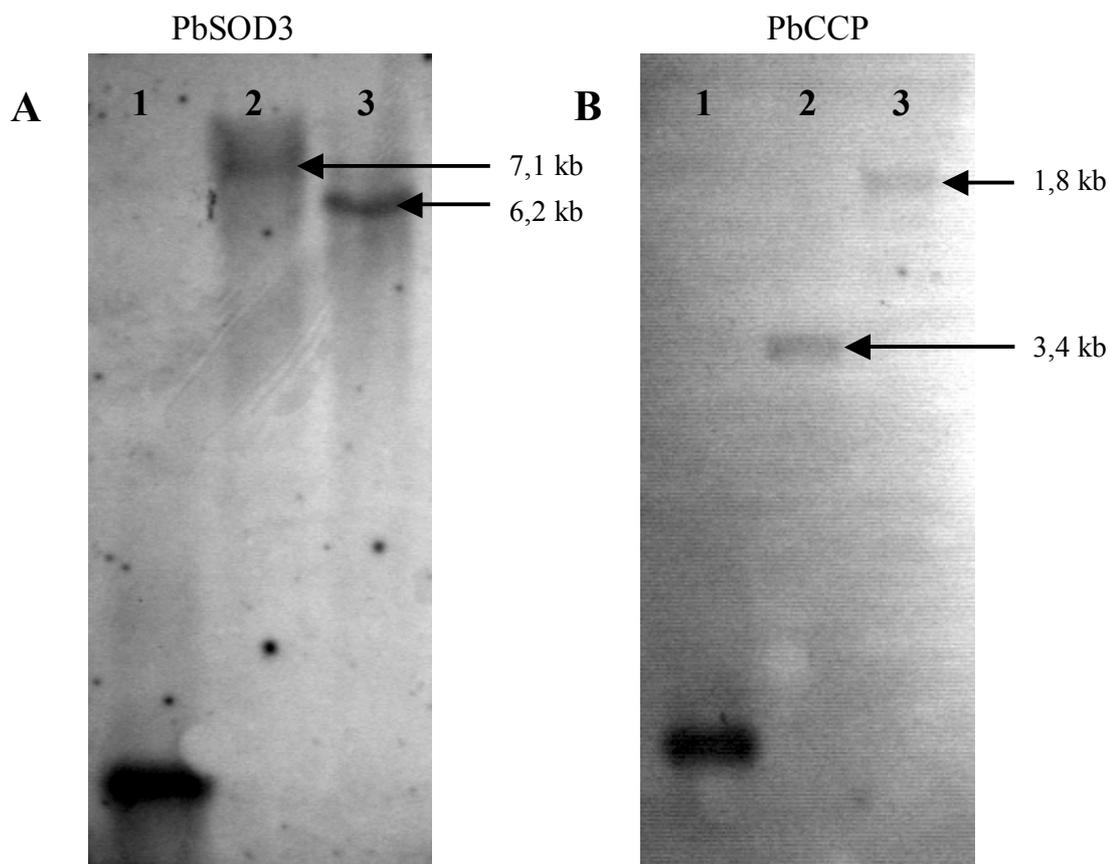
Organismo/ N° de acesso	Identidade (%)	Similaridade (%)	Valor e
<i>A. fumigatus</i> / XP_751914.1	55	62	8e-37
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> / Q5KIK5	61	72	2e-20
<i>N. crassa</i> / XP_964223.1	60	66	2e-35
<i>S. cerevisiae</i> / NP_012992.1	53	69	8e-15
<i>Ustilago maydis</i> / Q4PBY6	68	75	3e-26

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>, programa blastx

## 5.2. Determinação do número de cópias dos genes que codificam para PbSOD3 e PbCCP

Experimentos de Southern blot foram realizados com o objetivo de determinar o número de cópias dos genes que codificam para as enzimas PbSOD3 e PbCCP no genoma de *P. brasiliensis*. O fato de ter sido identificado apenas uma PbAEST no transcriptoma, tanto para PbSOD3 como para PbCCP, sugere que estas enzimas sejam codificadas por uma seqüência única no genoma. Para determinar o número de cópias dos genes que codificam para estas enzimas, o DNA genômico do fungo foi submetido à digestão com enzimas de restrição e após procedimento padrão, foi transferido para uma membrana de nylon e hibridizado com sondas específicas para cada um dos genes. Com base no perfil de restrição das seqüências de nucleotídeos dos cDNA obtidos do banco do transcriptoma, foram escolhidas enzimas de restrição que não possuem nenhum sítio de restrição nas respectivas seqüências. A figura 6A mostra o resultado do experimento para o gene que codifica para a enzima PbSOD3, no qual a digestão total do DNA genômico tanto com a enzima *ApaI* quanto com a enzima *SacII*, apresenta apenas uma banda revelada, indicando

que o gene que codifica para a PbSOD3 está representado por uma única cópia no genoma do fungo. A figura 6B mostra o resultado do experimento de Southern blot para o gene que codifica para a PbCCP, onde uma banda única de hibridização foi observada tanto na digestão do DNA genômico com *EcoRI* quanto com *HindIII*. Este resultado também indica que este gene está presente no genoma do fungo em cópia única.

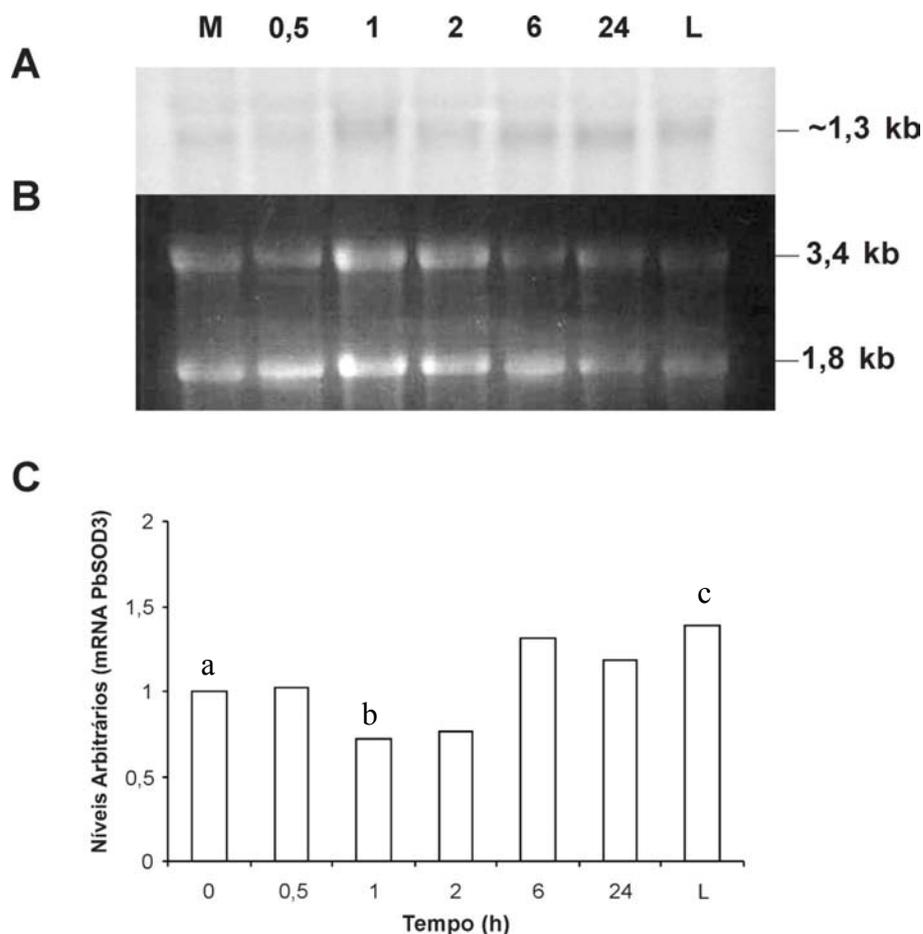


**Figura 6. Análise de Southern blot para determinação do número de cópias dos genes PbSOD3 e PbCCP de *P. brasiliensis*.** 15 microgramas de DNA total foram digeridos com enzimas de restrição, separados em gel de agarose 0,9%, transferidos para membrana de nylon e hibridizados com sondas específicas (Materiais e Métodos, seção 4.2.9). Para ambos os painéis, a coluna 1 mostra a hibridização de 5  $\eta$ g do fragmento de DNA usado como sonda específica para os genes das enzimas PbSOD3 ou PbCCP. As colunas 2 e 3 mostram o DNA genômico digerido com as enzimas *ApaI*, *SacII*, respectivamente (painel A) e *EcoRI*, *HindIII*, respectivamente (painel B). A membrana foi hibridizada com sonda quimioluminescente. As setas indicam o tamanho, em kb, aproximado das bandas reveladas.

### **5.3. Análise da expressão gênica da PbSOD3 durante a transição dimórfica e o choque térmico, por northern blot**

A expressão dos genes que codificam para as enzimas SOD3 e CCP de *P. brasiliensis* foi investigada através de northern blot em duas condições experimentais. A primeira foi durante a transição morfológica de *P. brasiliensis* de micélio (25 °C) para levedura (36 °C). Esta mudança de temperatura representa a condição necessária para que o fungo sofra o processo de transição *in vitro* e quando em contato com o hospedeiro, o dimorfismo é necessário para o estabelecimento da infecção. A outra condição escolhida foi do choque térmico das células de levedura a 42 °C, visto que em outros fungos esta condição de estresse é capaz de induzir uma resposta do sistema antioxidante, evidenciando a comunicação entre as vias de resposta ao estresse.

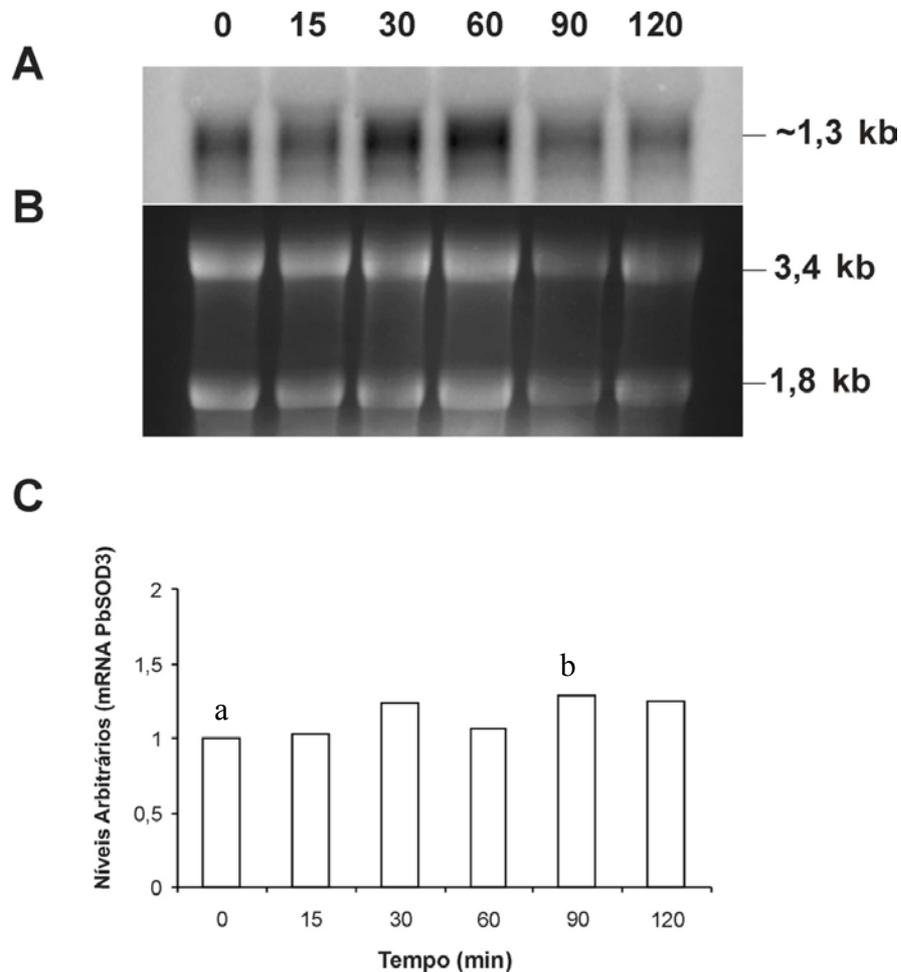
Como pode ser observado na figura 7, durante a transição de micélio para levedura ocorre uma ligeira oscilação da expressão do gene que codifica para a PbSOD3. Os valores arbitrários do mRNA variaram de 0,7 (1 hora) a 1,4 (L), apresentando um padrão oscilante de resposta durante a transição morfológica. Entretanto, se comparado os níveis arbitrários de mRNA da PbSOD3 entre micélio (0 h) e levedura (L), pode-se observar a alteração de 1,0 para 1,4, o que não foi considerado como alteração significativa. Em nossas análises de expressão diferencial de genes, seja por northern blot ou microarranjos de cDNA, o valor mínimo considerado para se afirmar se existe ou não uma alteração de expressão gênica em função de uma mudança de condição fisiológica qualquer é de 2,0 (Felipe *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2006).



**Figura 7. Análise da expressão da PbSOD3 por northern blot durante a transição de micélio para levedura.** O RNA total (15 µg) extraído das células de *P. brasiliensis* em cada um dos pontos da transição dimórfica foi fracionado em gel desnaturante de agarose 1,5% (painel B), transferido para membrana de nylon e hibridizado com sonda radioativa específica (painel A). A imagem foi digitalizada e analisada com o auxílio do programa ImageQuant®. O gráfico da densitometria das imagens (painel C) mostra os níveis arbitrários de mRNA da PbSOD3 nos pontos experimentais, os quais estão destacados os valores de M (a: 1,0), 1 h (b: 0,7) e L (c: 1,4). O tamanho aproximado, em kb, do mRNA da PbSOD3 está indicado no painel A e dos rRNAs no painel B.

Da mesma forma, como pode ser observado na figura 8, ocorre também apenas uma oscilação nos níveis de mRNA de PbSOD3 durante o choque térmico de 36 °C para 42 °C, variando de 1,0 (0 minuto, à temperatura de 36 °C) para no máximo 1,3 (após 90 minutos da temperatura alterada para 42 °C). Também nossa análise não considerou significativa esta alteração de expressão em função do choque térmico a 42 °C. As figuras 7 e 8 mostram que em nenhum ponto da análise ocorreu o dobro da expressão, reforçando a não alteração de padrão da expressão gênica para o gene que codifica para a PbSOD3, durante

a transição morfológica e também no choque térmico a 42 °C. O experimento de detecção da atividade enzimática durante o choque térmico foi realizado para a enzima PbSOD3, entretanto, os ensaios enzimáticos de oxidação do NADPH sofreram uma forte interferência pelo meio de cultura YPD, não possibilitando a determinação da atividade desta enzima.



**Figura 8. Análise da expressão da PbSOD3 por northern blot durante o choque térmico.** O RNA total (15 µg) extraído das leveduras de *P. brasiliensis* a 36 °C (0 min) e daquelas submetidas ao choque térmico a 42 °C por 15, 30, 60, 90 e 120 min foi fracionado em gel desnaturante de agarose 1,5% (painel B), transferido para membrana de nylon e hibridizado com sonda radioativa específica (painel A). A imagem foi digitalizada e analisada com o auxílio do programa ImageQuant<sup>®</sup>. O gráfico da densitometria das imagens (painel C) mostra os níveis arbitrários de mRNA da PbSOD3 nos pontos experimentais, os quais estão destacados os valores a 0 min, a 36 °C (a: 1,0) e 120 min a 42 °C (b: 1,3). O tamanho aproximado, em kb, do mRNA da PbSOD3 está indicado no painel A e dos rRNAs no painel B.

Desde a descoberta da EC-SOD em mamíferos, observou-se que alguns órgãos sólidos, como placenta, pulmão e pâncreas tinham maior atividade EC-SOD. A partir daí passou-se a investigar qual o papel desta enzima na patologia de algumas doenças. O tratamento com bleomicina é um modelo experimental para ativar a formação de fibrose pulmonar induzida por estresse oxidativo (Oury *et al.*, 1996). O estabelecimento da fibrose ocorre em duas fases, aguda e crônica. A primeira fase é caracterizada pelo influxo de células inflamatórias, em particular macrófagos e leucócitos polimorfonucleados (PMN). A fase crônica seguinte é caracterizada pelo remodelamento da matriz extracelular e deposição de colágeno (Adamson & Bowden, 1974; Fasske & Morgenroth, 1983). O papel da EC-SOD é o de proteger o colágeno da degradação pelo radical superóxido, os fragmentos de colágeno são capazes de exercer atração química para outras moléculas e ativar os neutrófilos, aumentando, assim, a resposta inflamatória local. Neste modelo de fibrose pulmonar induzida, camundongos que superexpressam a EC-SOD humana nos seus pulmões, apresentaram até 53% de redução nas evidências histológicas da patologia do pulmão, e 17% menos colágeno no pulmão, indicando claramente uma menor formação da fibrose (Bowler *et al.*, 2002). Em contrapartida, camundongos mutantes que não expressam EC-SOD, apresentam aumento nos danos ao pulmão após tratamento com bleomicina.

Em fungos patogênicos, Martchenko e colaboradores (2004) relataram recentemente que a transcrição do gene SOD5 de *C. albicans* é induzida durante a diferenciação celular de levedura para hifa (forma instalada no hospedeiro) e que esta indução é mais dependente da presença de soro do que da alteração de temperatura de 30 °C para 37 °C. Além disto, o gene SOD5 também é induzido tanto por estresse osmótico quanto oxidativo. Mostraram também, que a deleção do gene SOD5 produziu um mutante viável que mostrou sensibilidade ao peróxido de hidrogênio e que a proteína Sod5 parece ser necessária para a virulência de *C. albicans*, em modelo de infecção de camundongos. Entretanto, o mutante SOD5 mostrou a mesma resistência ao ataque pelos macrófagos que a linhagem parental, o que sugere que a enzima Sod5 não protege *C. albicans* contra injúrias oxidativas pelo macrófago. Fradin e colaboradores (2005) relataram em *C. albicans* resultados de experimentos de exposição das células de *C. albicans* (fase leveduriforme) ao sangue e suas frações (PMN, polimorfonucleados - rico em neutrófilos e MNC, mononucleados). Os resultados mostraram que as células expostas à fração rica em neutrófilos (PMN) inibiam o dimorfismo e aumentava a expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse, incluindo a SOD5. Também foi obtido um mutante ( $\Delta sod5$ ) para este

gene (SOD5), que foi incubado com sangue e suas frações. Os resultados mostraram que os mutantes incubados com sangue e com a fração PMN tiveram sua taxa de sobrevivência diminuída quando comparada à sobrevivência do tipo selvagem (sendo esta taxa menor no mutante inoculado com PMN) mostrando que mutante para o gene SOD5 é mais sensível aos neutrófilos (Fradin *et al.*, 2005). Este dado reforça o resultado anterior relatado de Martchenko e colaboradores (2004) de que a enzima Sod5 GPI-ancorada de *C. albicans* deve exercer seu papel protetor contra o estresse oxidativo via neutrófilos e não via macrófagos.

Este nosso trabalho mostra, assim como o que ocorre em *C. albicans*, que em *P. brasiliensis* também não foi detectado indução do gene PbSOD3 durante a alteração de temperatura de 25 °C para 36°C, *in vitro*. Entretanto, dados recentes de experimentos *in vivo* em nosso grupo, de comparação da expressão de genes da levedura de *P. brasiliensis* cultivada *in vitro* com a levedura recuperada do interior de macrófagos, mostram que a expressão do gene que codifica para a PbSOD3 está 13 vezes aumentada na levedura recuperada do macrófago (Tavares, A. H. P. & Silva, S., teses de doutorado, em andamento). Este resultado de superexpressão da PbSOD3 no interior dos macrófagos foi confirmado por Real-Time PCR, o que sugere que mesmo o fungo estando apto a neutralizar as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio ainda na forma de micélio, o microambiente do interior dos macrófagos parece ser capaz de modular o aumento da expressão do gene que codifica para PbSOD3 (13x). Nesse contexto, qual seria papel da SOD GPI-ancorada de *P. brasiliensis* durante o curso da infecção, considerando os dados acima relatados em mamíferos e fungos na interação patógeno-hospedeiro? Uma primeira possibilidade é de que a enzima SOD GPI-ancorada do fungo estaria atuando no sentido de proteger o fungo contra o estresse oxidativo e a extracelular do hospedeiro atuando contra a formação da fibrose pulmonar. A fibrose é a principal seqüela da PCM e a qualidade de vida do paciente seria melhorada caso se conseguisse evitar a sua formação (Mendes, R. P., comunicação pessoal). A ausência da SOD GPI-ancorada no *P. brasiliensis* deve ser testada para investigar quais seriam as conseqüências na interação do fungo com o modelo experimental de camundongos, ou seja, se seria vantajoso ou não para o hospedeiro. O esperado é que o *P. brasiliensis* se torne menos virulento como o que ocorreu em *C. albicans* e que o hospedeiro, que também expressa a sua SOD extracelular, consiga responder no sentido de diminuir a seqüela da fibrose pulmonar, melhorando o quadro geral da doença, a PCM. Alternativamente, ambas as enzimas, do fungo e do hospedeiro,

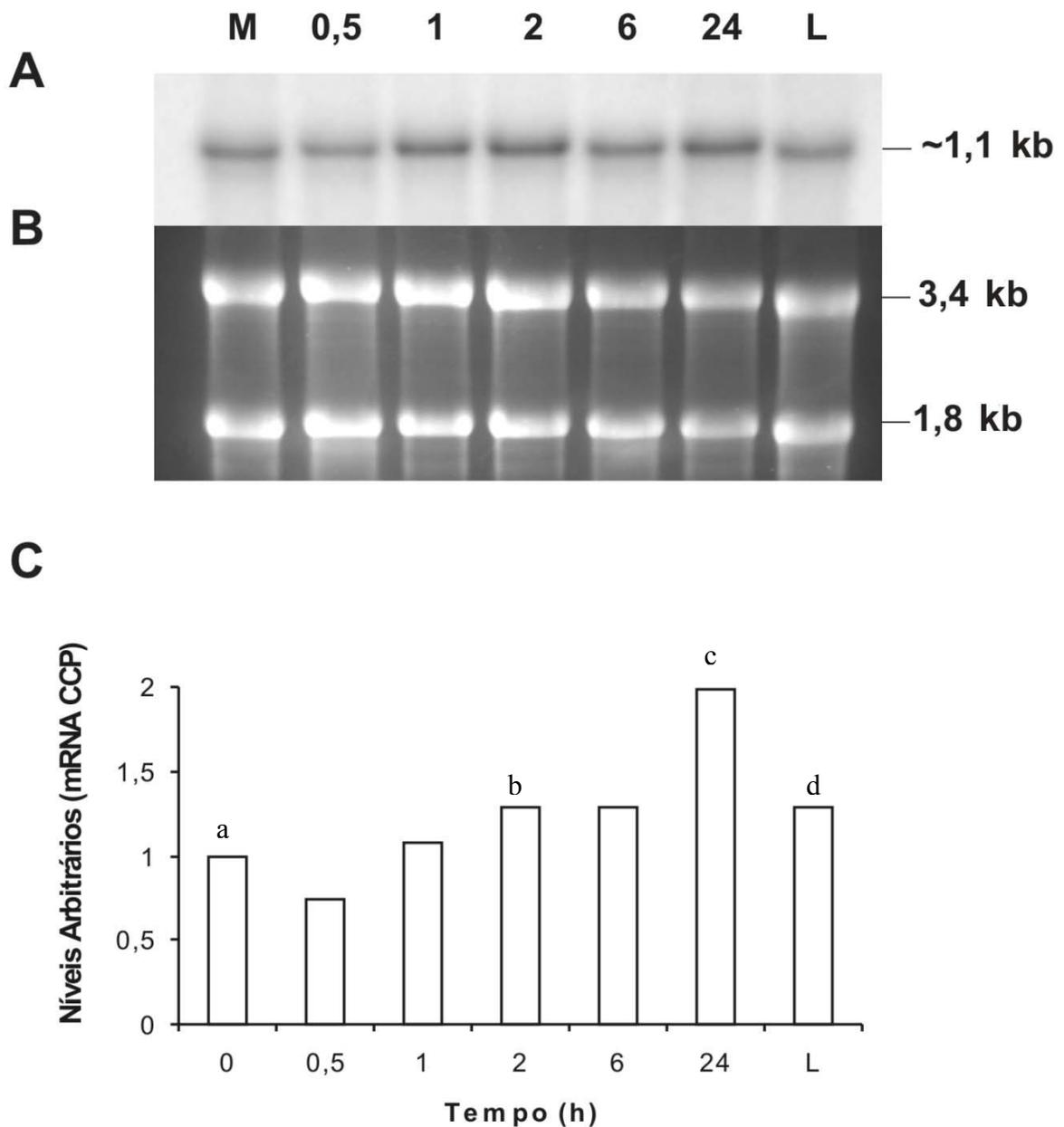
poderiam estar atuando em sinergia no sentido de diminuir a formação da fibrose, o que seria vantajoso para a sobrevivência dos dois organismos, o que provavelmente não melhoraria o quadro geral da doença. Experimentos de RNAi ou nocaute do gene *sod3* de *P. brasiliensis* devem ser realizados para efetivamente demonstrar se a presença desta enzima é importante no processo de proteção contra estresse oxidativo e na formação da fibrose, nos modelos de infecção de camundongos por este patógeno.

Os ensaios de medida de atividade enzimática extracelular para a enzima SOD de *P. brasiliensis*, utilizando o meio de cultura das células de levedura, não detectaram atividade desta enzima (dados não mostrados), o que sugere fortemente que a mesma deve estar associada à parede celular e/ou membrana celular. Experimentos de fracionamento celular para obtenção da parede e/ou membrana celular deste patógeno devem ainda ser realizados visando a localização desta enzima nos compartimentos celulares mencionados.

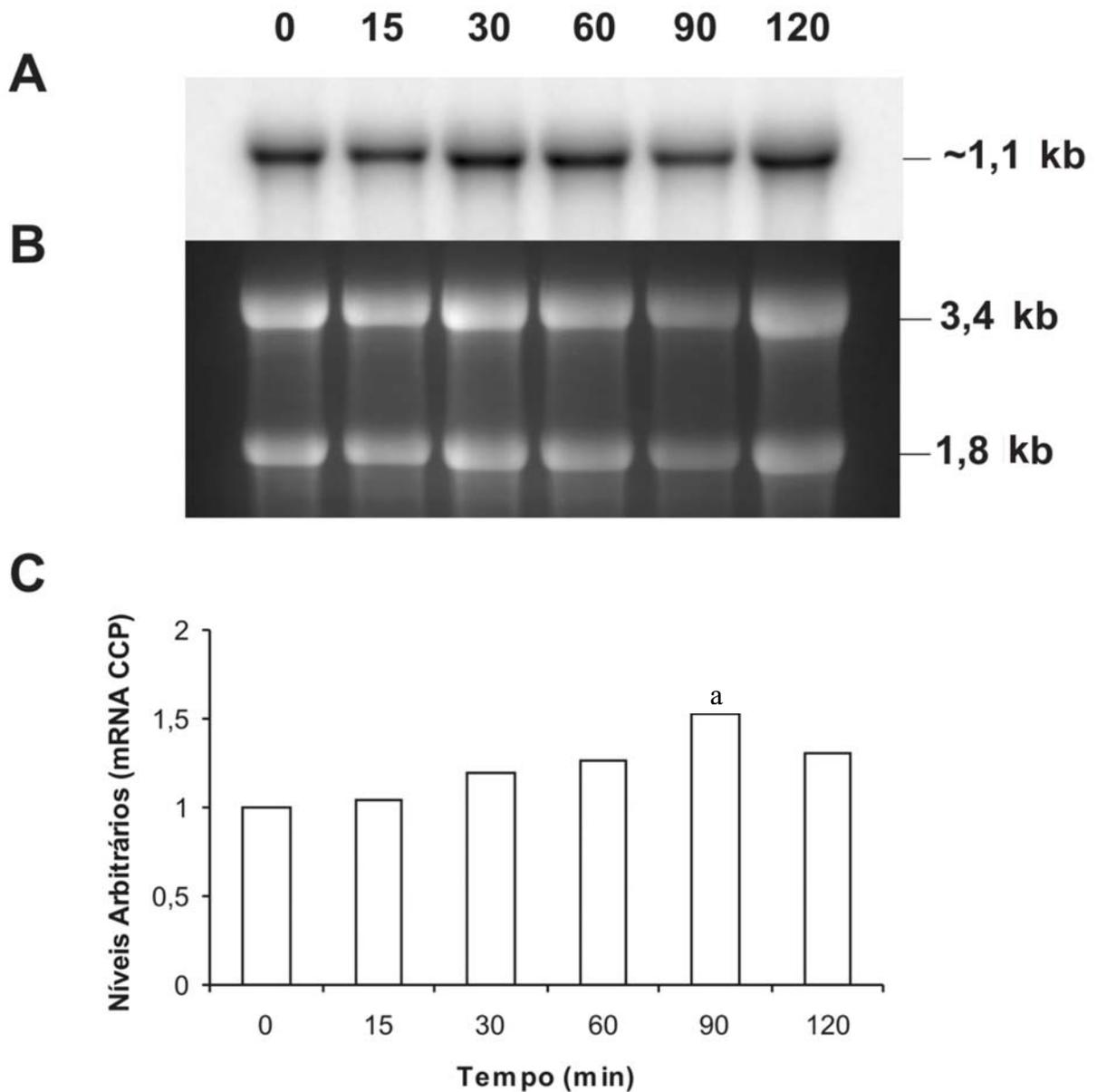
#### **5.4. Análise da expressão gênica da PbCCP durante a transição dimórfica e o choque térmico, por northern blot.**

Os resultados obtidos neste trabalho, relativos à análise da expressão do gene *ccp* do *P. brasiliensis* estão mostrados na Figura 9, onde se observa que ocorreu oscilação na expressão de PbCCP durante a transição morfológica de micélio para levedura. Após 2 horas de mudança da temperatura de 26 °C para 36 °C, observa-se aumento dos níveis de mRNA de PbCCP e em 24 horas ocorre o máximo da expressão do gene (2x) de PbCCP. Este valor alcançou o critério mínimo de 2x, considerado pelas análises de variação de expressão gênica como significativa pelo nosso grupo. Entretanto, quando se compara o nível de expressão entre micélio (0 h) e levedura (L) observa-se que os valores para levedura (1,3) são próximos daqueles encontrados em micélio (1,0).

Na condição de choque térmico (Figura 10) ocorre um pequeno e gradual aumento nos níveis de expressão de PbCCP nos pontos de 15, 30 e 60 minutos após o choque térmico, chegando-se ao maior nível de mRNA no ponto de 90 minutos (1,5). Estes valores não alcançaram o critério adotado pelo nosso grupo (2x), portanto nossa análise não considerou esta variação como significativa. Estes resultados mostram que, em *P. brasiliensis*, o padrão da expressão do gene *ccp* apresenta uma alteração, em nível transcricional, de no máximo 2x durante a transição dimórfica (26 °C para 36 °C) e que não apresenta alteração durante o choque térmico de 36 °C para 42 °C.



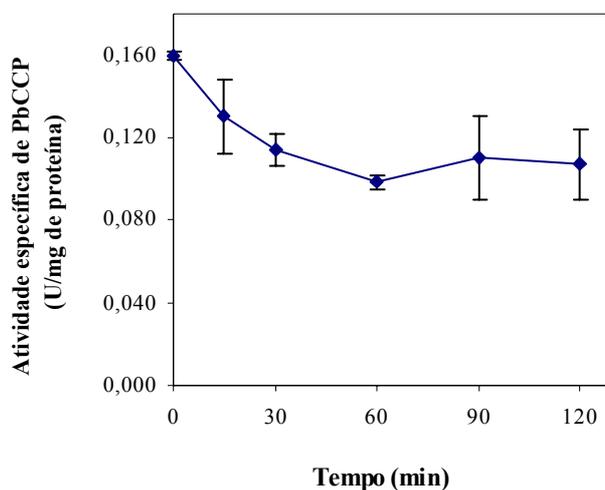
**Figura 9. Análise da expressão da PbCCP por northern blot durante a transição de micélio para levedura.** O RNA total (15 µg) extraído das células de *P. brasiliensis* em cada um dos pontos da transição dimórfica foi fracionado em gel desnaturante de agarose 1,5% (painel B), transferido para membrana de nylon e hibridizado com sonda radioativa específica (painel A). A imagem foi digitalizada e analisada com o auxílio do programa ImageQuant<sup>®</sup>. O gráfico da densitometria das imagens (painel C) mostra os níveis arbitrários de mRNA da PbCCP nos pontos experimentais, os quais estão destacados os valores de M (a: 1,0), 2 h (b: 1,3), 24 h (c: 2,0) e L (d: 1,3). O tamanho aproximado, em kb, do mRNA da PbCCP está indicado no painel A e dos rRNAs no painel B



**Figura 10. Análise da expressão da PbCCP por northern blot durante o choque térmico.** O RNA total (15  $\mu$ g) extraído das leveduras de *P. brasiliensis* a 36 °C (0 min) e daquelas submetidas ao choque térmico a 42 °C por 15, 30, 60, 90 e 120 min foi fracionado em gel desnaturante de agarose 1,5% (painel B), transferido para membrana de nylon e hibridizado com sonda radioativa específica (painel A). A imagem foi digitalizada e analisada com o auxílio do programa ImageQuant<sup>®</sup>. O gráfico da densitometria das imagens (painel C) mostra os níveis arbitrários de mRNA da PbCCP nos pontos experimentais, destacando-se o valor máximo atingido 1,5 (a) no ponto 90 min a 42 °C. O tamanho aproximado, em kb, do mRNA da PbCCP está indicado no painel A e dos rRNAs no painel B.

## 5.5. Análise da atividade enzimática da PbCCP durante o choque térmico

Com o objetivo de verificar se, mesmo não ocorrendo uma variação significativa da expressão do gene *ccp* em nível transcricional no choque térmico, o patógeno apresentaria alteração da atividade da enzima já pré-sintetizada foram então realizados ensaios de medida da atividade enzimática total para esta enzima, utilizando extratos protéicos das células de levedura a 36°C e durante o choque térmico a 42°C. Os resultados estão mostrados na figura 11. Observa-se que ocorreu uma variação significativa na atividade da enzima PbCCP durante essa condição experimental, diminuindo de 100% para 62% a sua atividade específica aos 60 minutos, permanecendo próximo a este valor até o tempo de 120 minutos de choque térmico. Entretanto, mesmo após este tempo máximo de exposição à temperatura de 42°C, a atividade da enzima ainda permaneceu em patamares elevados, indicando que provavelmente este patógeno é capaz de responder às injúrias de estresse oxidativo também durante esta condição de drástica alteração fisiológica. Não existem relatos na literatura sobre dados de atividade enzimática da CCP durante o choque térmico, para outros fungos patogênicos.



**Figura 11. Atividade específica (U/mg de proteína) da PbCCP.** Células de *P. brasiliensis* na forma de levedura foram submetidas ao choque térmico de 36 °C para 42 °C. A determinação da atividade enzimática da CCP foi realizada conforme descrito no item 4.2.13 (Materiais e Métodos). Os dados obtidos foram submetidos ao teste-t, com nível de significância  $p \leq 0.05$ .

Um aspecto importante do *P. brasiliensis* é sua notável resistência ao tratamento *in vitro* com peróxido de hidrogênio. Leveduras de *P. brasiliensis* tratadas com altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25, 50, 75 e 100 mM) tanto na fase estacionária quanto na fase exponencial apresentam sobrevivência superior a 70% após o tratamento por 1h e 6h (Dantas *et al.*, submetido). Em *S. cerevisiae*, células crescidas até a fase exponencial e tratadas com apenas 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 15 minutos apresentam taxa de sobrevivência apenas de 2% (Collinson & Dawes, 1992), enquanto o fungo patogênico *C. albicans* tratado com 50 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, observou-se uma taxa de sobrevivência de apenas 0,1% após 1 hora de tratamento (Jamieson *et al.*, 1996). Kwon e colaboradores (2003) mostraram que na levedura *S. cerevisiae* a expressão do gene CCP aumenta quando as células são tratadas com peroxinitrito, peróxido de hidrogênio ou quando cultivadas em condições aeróbicas. Mostraram ainda, que mutantes para o gene que codifica para esta enzima são viáveis e mais sensíveis ao peróxido de hidrogênio, evidenciando que a enzima Ccp não é essencial para o crescimento celular ou para a respiração aeróbica e que, provavelmente, as espécies reativas de oxigênio geradas durante a respiração são eficientemente detoxificadas por um sistema antioxidante complementar. Em *C. neoformans*, o mutante para o gene da CCP é mais susceptível ao peróxido de hidrogênio exógeno, apresentam um defeito de crescimento quando estão no interior do macrófago, entretanto o mutante é tão virulento quanto o tipo selvagem, mostrando que essa enzima contribui para a neutralização de espécies reativas de oxigênio, mas ela deve ter função redundante na célula (Giles *et al.*, 2005). Os dados obtidos em nosso trabalho sugerem que provavelmente a citocromo c peroxidase já se encontra em nível elevado de atividade, desde a forma de micélio, suficiente para responder às injúrias oxidativas ou então que ela não deve contribuir para a imediata detoxificação do peróxido de hidrogênio. Neste caso, outras peroxidases e/ou as catalases, devem atuar de maneira mais rápida na eliminação do peróxido de hidrogênio, cabendo a citocromo c peroxidase, exercer papel fundamental na detoxificação de EROS, seja de origem endógena ou exógena, principalmente no interior da mitocôndria, onde se encontra compartimentalizada. Não existem relatos na literatura de estudos do padrão de expressão gênica da CCP em outros fungos dimórficos e patogênicos, como *C. albicans*, *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* entre outros.

Os resultados relatados neste trabalho de análise da expressão da SOD GPI-ancorada mostraram que não ocorreu uma alteração significativa durante o choque térmico a 42°C. Abrashev e colaboradores (2005) mostraram em *A. niger* que, quando as células

deste fungo foram submetidas ao choque térmico, ocorreu aumento das atividades enzimáticas da SOD e catalase, não relatando, entretanto, a atividade da CCP, opondo-se aos nossos dados em *P. brasiliensis*. Os nossos resultados reforçam a hipótese de que o *P. brasiliensis* provavelmente está adaptado às injúrias provocadas pelo estresse oxidativo já na forma de micélio, pelo menos no que diz respeito à SOD GPI-ancorada e a PbCCP, uma vez que não foram detectadas alteração de expressão gênica para estas enzimas durante a transição dimórfica. A adaptação deste patógeno parece ser em função da temperatura e a resposta do sistema antioxidante pode ser diferente na presença de outros estímulos. Missall e colaboradores (2004) consideram que o sistema antioxidante necessariamente co-evoluiu com o advento do crescimento aeróbico das células, e que um sistema antioxidante complexo, com várias possibilidades de mecanismos e redundância ou sobreposição entre as vias de defesa antioxidante, permitem a máxima proteção e flexibilidade para a adaptação do organismo às mudanças ambientais. Esta flexibilidade e multiplicidade nesses mecanismos de defesa são particularmente importantes para os microrganismos patogênicos que existem livres no ambiente e passam a viver no interior de um hospedeiro, cuja resposta imune baseia-se em um ataque oxidativo contra o patógeno. Provavelmente, estes patógenos de vida livre encontram neste modo de vida diversas fontes de estresse, incluindo o oxidativo, no qual, as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são formadas a partir de radiação UV, de subprodutos da dinitrificação ou da atividade fagocitária de outros microrganismos. O ambiente destes microrganismos, portanto, é muito diversificado e aqueles que possuem um sistema antioxidante eficiente tem a possibilidade de adaptar-se melhor. É mais provável, portanto, que estes patógenos tenham se adaptado a partir do seu nicho de vida livre no ambiente e isto permitiu também a sobrevivência no hospedeiro e não que tenham desenvolvido mecanismos adicionais ou especializados para que sobrevivessem no hospedeiro. No caso particular do fungo *P. brasiliensis* os dados deste trabalho sugerem que este patógeno está adaptado desde a forma de micélio para combater o estresse oxidativo.

## 6. CONCLUSÕES

- 1- Os genes potencialmente envolvidos na resposta ao estresse oxidativo identificados no transcriptoma do *P. brasiliensis* foram categorizados em 4 classes: enzimas antioxidantes (12 seqüências), biossíntese e metabolismo da glutathiona e regeneração de NADPH (11 seqüências), homeostase de íons metálicos (3 seqüências) e fatores transcricionais (7 seqüências).
- 2- Os genes que codificam para as enzimas antioxidantes para detoxificação de espécies reativas e enzimas envolvidas no metabolismo de glutathiona presentes no transcriptoma do *P. brasiliensis* representam todo o arsenal enzimático contra o estresse oxidativo descrito em outros organismos, com exceção da glutathiona peroxidase que não foi encontrada em nossa análise. Entretanto, deve-se ressaltar que o transcriptoma do *P. brasiliensis* descreveu cerca de 80% dos genes estimados em seu genoma, não se podendo ainda afirmar se este gene encontra-se ausente no sistema de defesa deste patógeno.
- 3- Os genes que codificam para proteínas envolvidas na homeostase de íons bem como aqueles que codificam para os fatores de transcrição também representam a maioria dos genes descritos em outros organismos, com exceção da ferritina (controle da homeostase de Fe) bem como os fatores de transcrição Msn2/Msn4, os quais também estão ausentes em *C. albicans*.
- 4- A seqüência de cDNA que codifica para a CuZnSOD GPI-ancorada (PbSOD3) de *P. brasiliensis* está completa. A enzima possui massa molecular deduzida de 24,3 kDa e pI estimado em 6,05. A seqüência da proteína deduzida possui a assinatura característica de enzima CuZnSOD - [GA]-[IMFAT]-H-[LIVF]-H-x(2)-[GP]-[SDG]-x-[STAGDE] - e a região de ancoragem a GPI conservada na região carboxi-terminal.
- 5- A análise das seqüências deduzida das enzimas PbSOD3 e Sod5 de *C. albicans* indicou cerca de 40% de similaridade em toda a extensão da proteína; de fato estas proteínas são mais conservadas nas regiões das assinaturas do sítio catalítico e da região de ancoragem ao GPI. Por outro lado, a similaridade entre as enzimas SOD intracelulares de *P. brasiliensis* e *C. albicans* atinge o valor de cerca de 85%.
- 6- A análise no programa PSORT II indica que a PbSOD3 deve estar localizada na parede celular (34,8% de probabilidade) e com a mesma probabilidade, pode estar localizada na membrana celular.

- 7- A seqüência de cDNA que codifica para a PbCCP está parcial. A seqüência parcial da proteína deduzida mostra a presença do sítio ativo da peroxidase, caracterizado pela região [SGATV]-{D}-x(2)-[LIVMA]-R-[LIVMA]-x-[FW]-H-{V}-[SAC], a qual se mostrou bastante conservada quando comparada com estas enzimas de outros fungos. A análise das seqüências deduzida das enzimas PbCCP e CCPs de outros fungos patogênicos e não-patogênicos indicou cerca de 62-75% de similaridade.
- 8- A análise de Southern blot indicou que os genes que codificam para as enzimas PbSOD3 e CCP estão presentes no genoma do fungo em cópia única.
- 9- A análise da expressão dos genes que codificam para a PbSOD3 e PbCCP mostrou que ocorreu uma oscilação durante a transição dimórfica *in vitro*. Entretanto, quando se compara o nível de expressão para ambos os genes, entre as formas de micélio e levedura, observa-se que não ocorreu uma alteração do padrão de expressão significativamente diferente. Também não ocorreu variação significativa da expressão para ambos os genes, em nível transcricional, durante o choque térmico a 42 °C.
- 10- Os ensaios de medida de atividade enzimática extracelular para a enzima SOD de *P. brasiliensis*, utilizando o meio de cultura das células de levedura, não detectaram atividade desta enzima (dados não mostrados), sugerindo que a mesma deve estar associada à parede celular e/ou membrana celular.
- 11- A atividade enzimática da CCP de *P. brasiliensis* durante o choque térmico a 42 °C diminuiu em função do tempo de incubação das células de levedura, indicando que provavelmente este patógeno é capaz de responder às injúrias de estresse oxidativo durante esta condição de drástica alteração fisiológica.
- 12- Os dados sugerem fortemente que o *P. brasiliensis* está apto, desde a forma de micélio, a responder contra as injúrias de estresse oxidativo, uma vez que este patógeno apresenta níveis similares de expressão dos genes SOD3 e CCP nas duas formas, micélio e levedura.

## 7. PERSPECTIVAS

- 1- Determinar qual a contribuição individual da PbSOD3 e PbCCP no sistema antioxidante *in vitro*, por meio de desafios com agentes oxidantes como peróxido de hidrogênio e menadiona e avaliação da expressão dos genes e atividades enzimáticas.
- 2- Investigar a localização celular da PbSOD3, através de ensaios de imunocitocalização utilizando anticorpos anti-PbSOD3 ou por fusão com GFP.
- 3- Avaliar a contribuição da PbSOD3 para a virulência de *P. brasiliensis* e determinar o seu papel na imunopatologia da PCM, inclusive no que se refere a sua possível contribuição na evolução da fibrose, através do nocaute ou silenciamento gênico da PbSOD3.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrashev, R., Dolashka, P., Christova, R., Stefanova, L. and Angelova, M. (2005). Role of antioxidant enzymes in survival of conidiospores of *Aspergillus niger* 26 under conditions of temperature stress. *J Appl Microbiol* **99**: 902-909.
- Adamson, I. Y. and Bowden, D. H. (1974). The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol* **77** (2): 185-197.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* **90** (17): 7915-7922.
- Andrade, R. V., Paes, H. C., Nicola, A. M., de Carvalho, M. J. A., Fachin, A. L., Cardoso, R. S., Silva, S. S., Fernandes, L., Silva, S. P., Donadi, E. A., Sakamoto-Hojo, E. T., Passos, G. A. S., Soares, C. M. A., Brigido, M. M. and Felipe, M. S. S. Cell organisation, sulphur metabolism and ion transport-related genes are differentially expressed in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium and yeast cells. *BMC Genomics*, *in press*.
- Andrade, R. V., da Silva, S. P., Torres, F. A., Poças-Fonseca, M. J., Silva-Pereira, I., Maranhao, A. Q., Campos, E. G., Moraes, L. M., Jesuino, R. S., Pereira, M., Soares, C. M., Walter, M. E., Carvalho, M. J., Almeida, N. F., Brigido, M. M. and Felipe, M. S. (2005). Overview and perspectives on the transcriptome of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev Iberoam Micol* **22** (4): 203-212.
- Bagagli, E., Sano, A., Coelho, K. I., Alquati, S., Miyaji, M., de Camargo, Z. P., Gomes, G. M., Franco, M. and Montenegro, M. R. (1998). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasyurus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* **58** (4): 505-512.
- Bialek, R., Ibricevic, A., Fothergill, A. and Begerow, D. (2000). Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. *J Clin Microbiol* **38** (9): 3190-3193.
- Bocca, A. L., Hayashi, E. E., Pinheiro, A. G., Furlanetto, A. B., Campanelli, A. P., Cunha, F. Q. and Figueiredo, F. (1998). Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. *J Immunol* **161**: 3056-3063.
- Bowler, R. P., Nicks, M., Warnick, K. and Crapo, J. D. (2002). Role of extracellular superoxide dismutase in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282** (4): L719-726.
- Brummer, E., Hanson, L. H. and Stevens, D. A. (1988). Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. *Int J Immunopharmacol* **10** (8): 945-952.
- Brummer, E., Hanson, L. H., Restrepo, A. and Stevens, D. A. (1989). Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect Immun* **57** (8): 2289-2294.

- Brummer, E., Castaneda, E. and Restrepo, A. (1993). Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* **6**: 89-117.
- Cano, M. I., Cisalpino, P. S., Galindo, I., Ramirez, J. L., Mortara, R. A., and da Silveira, J. F. (1998). Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol* **36** (3): 742-747.
- Cano, L. E., Kashino, S. S., Arruda, C., André, D., Xidieh, C. F., Singer-Vermes, L. M., Vaz, C. A., Burger, E. and Calich, V. L. (1998). Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* **66**: 800-806.
- Calich, V. L. and 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.
- Campos, E. G., Jesuino, R. S. A., Dantas, A. S., Brígido, M. M. and Felipe, M. S. (2005). Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Genet Mol Res* **4** (2): 409-429.
- Carbonell, L. M. (1969). Ultrastructure of dimorphic transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* **100**: 1076-1082.
- Carlsson, L. M., Jonsson, J., Edlund, T. and Marklund, S. L. (1995). Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (14): 6264-6268.
- Carmo, J. P., Dias-Melicio, L. A., Calvi, S. A., Peraçoli, M. T. and Soares, A. M. (2006). TNF- $\alpha$  activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent mechanism. *Med Mycol* **44** (4): 363-368.
- Castro, N. S., Maia, Z. A., Pereira, M. and Soares, C. M. (2005). Screening for glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet Mol Res* **4** (2): 326-345.
- Catlett, N. L., Yoder, O. C. and Turgeon, B. G. (2003). Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryot Cell* **2** (6): 1151-1161.
- Chauhan, N., Latge, J. P. and Calderone, R. (2006). Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nat Rev Microbiol* **4** (6): 435-444.
- Collinson, L. P. and Dawes, I. W. (1992). Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress. *J Gen Microbiol* **138** (2): 329-335.
- Coutinho, Z. F., Silva, D., Lazera, M., Petri, V., Oliveira, R. M., Sabroza, P. C. and Wanke, B. (2002). Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica* **18** (5): 1441-1454.
- Cox, G. M., Harrison, T. S., McDade, H. C., Taborda, C. P., Heinrich, G., Casadevall, A. and Perfect, J. R. (2003). Superoxide dismutase influences the virulence of

- Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infect Immun* **71**: 173-180.
- Cunha, A. F., Sousa, M. V., Silva, S. P., Jesuino, R. S., Soares, C. M. and Felipe, M. S. (1999). Identification, N-terminal region sequencing and similarity analysis of differentially expressed proteins in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol* **37**: 115-121.
- Czapski, G. (1984). Reaction of OH. *Methods Enzymol* **105**: 209-215.
- Dantas, A. S. (2005). Resposta antioxidante ao estresse oxidativo do fungo dimórfico e patogênico *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Departamento de Biologia Celular. Universidade de Brasília.
- Dantas, A. S., Andrade, R. V., de Carvalho, M. J., Felipe, M. S. S. and Campos, E. G. (2006). Response to hydrogen peroxide in *Paracoccidioides brasiliensis*: assessing catalase and cytochrome-c peroxidase, submetido.
- De Brito, T. and Franco, M. F. (1994). Granulomatous inflammation. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **36** (2): 185-192.
- De Carvalho, M. J., Amorim Jesuino, R. S., Daher, B. S., Silva-Pereira, I., de Freitas, S. M., Soares, C. M. and Felipe, M. S. (2003). Functional and genetic characterization of calmodulin from the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* **39** (3): 204-210.
- Enjalbert, B., Nantel, A. and Whiteway, M. (2003). Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response. *Mol Biol Cell* **14** (4): 1460-1467.
- Erman, J. E. and Vitello, L. B. (2002). Yeast cytochrome c peroxidase: mechanistic studies via protein engineering. *Biochim Biophys Acta* **1597**: 193-220.
- Estruch, F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* **24** (4): 469-486.
- Fasske, E. and Morgenroth, K. (1983). Experimental bleomycin lung in mice. A contribution to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Lung* **161** (3): 133-146.
- Feder, M. E. and Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* **61**: 243-282.
- 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. and Camargo, Z. P. (2003). Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* **39** (1): 60-69.
- Felipe, M. S., Andrade, R. V., Petrofeza, S. S., Maranhao, A. Q., Torres, F. A., Albuquerque, P., Arraes, F. B., Arruda, M., Azevedo, M. O., Baptista, A. J.,

- Bataus, L. A., Borges, C. L., Campos, E. G., Cruz, M. R., Daher, B. S., Dantas, A., Ferreira, M. A., Ghil, G. V., Jesuino, R. S., Kyaw, C. M., Leitao, L., Martins, C. R., Moraes, L. M., Neves, E. O., Nicola, A. M., Alves, E. S., Parente, J. A., Pereira, M., Poças-Fonseca, M. J., Resende, R., Ribeiro, B. M., Saldanha, R. R., Santos, S. C., Silva-Pereira, I., Silva, M. A., Silveira, E., Simoes, I. C., Soares, R. B., Souza, D. P., De-Souza, M. T., Andrade, E. V., Xavier, M. A., Veiga, H. P., Venancio, E. J., Carvalho, M. J., Oliveira, A. G., Inoue, M. K., Almeida, N. F., Walter, M. E., Soares, C. M. and Brigido, M. M. (2003). Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast* **20** (3): 263-271.
- Felipe, M. S., Andrade, R. V., Arraes, F. B., Nicola, A. M., Maranhao, A. Q., Torres, F. A., Silva-Pereira, I., Poças-Fonseca, M. J., Campos, E. G., Moraes, L. M., Andrade, P. A., Tavares, A. H., Silva, S. S., Kyaw, C. M., Souza, D. P., PbGenome Network, Pereira, M., Jesuino, R. S., Andrade, E. V., Parente, J. A., Oliveira, G. S., Barbosa, M. S., Martins, N. F., Fachin, A. L., Cardoso, R. S., Passos, G. A., Almeida, N. F., Walter, M. E., Soares, C. M., Carvalho, M. J. and Brigido, M. M. (2005). Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem* **280** (26): 24706-24714.
- Felipe, M. S., Torres, F. A., Maranhao, A. Q., Silva-Pereira, I., Poças-Fonseca, M. J., Campos, E. G., Moraes, L. M., Arraes, F. B., Carvalho, M. J., Andrade, R. V., Nicola, A. M., Teixeira, M. M., Jesuino, R. S., Pereira, M., Soares, C. M. and Brigido, M. M. (2005). Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **45** (3): 369-381.
- Fernandes, L., Araujo, M. A., Amaral, A., Reis, V. C., Martins, N. F. and Felipe, M. S. (2005). Cell signaling pathways in *Paracoccidioides brasiliensis* - inferred from comparisons with other fungi. *Genet Mol Res* **4** (2): 216-231.
- Folz, R. J., Abushama, A. M. and Suliman, H. B. (1999). Extracellular superoxide dismutase in the airways of transgenic mice reduces inflammation and attenuates lung toxicity following hyperoxia. *J Clin Invest* **103** (7): 1055-1066.
- Fradin, C., de Groot, P., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F. C. and Hube, B. (2005). Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* **56** (2): 397-415.
- Franco, M. (1987). Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* **25** (1): 5-18.
- Franco, M., Peraçoli, M. T., Soares, A., Montenegro, R., Mendes, R. P. and Meira, D. A. (1993). Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol* **5**: 115-149.
- Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno, A. and Del Negro, G. (eds). (1994). *Paracoccidioidomycosis*. Boca Ratón: CRC Press. 448 p.
- Fridovich, I. (1975). Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* **44**: 147-159.

- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical ( $O_2^{\bullet-}$ ), superoxide dismutases and related matters. *J Biol Chem* **272**: 18515-18517.
- Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* **201**: 1203-1209.
- Furtado, J. S., de Brito, T. and Freymuller, E. (1967). The structure and reproduction of *Paracoccidioides brasiliensis* in human tissue. *Sabouraudia* **5**: 226-229.
- Gaut, J. P., Yeh, G. C., Tran, H. D., Byun, J., Henderson, J. P., Richter, G. M., Brennan, M. L., Lusic, A. J., Belaaouaj, A., Hotchkiss, R. S. and Heinecke, J. W. (2001). Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** (21): 11961-11966.
- Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P. and Fenn, W. O. (1954). Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science* **119**: 623-626.
- Giles, S. S., Perfect, J. R. and Cox, G. M. (2005). Cytochrome c peroxidase contributes to the antioxidant defense of *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet Biol* **42** (1): 20-29.
- 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., Nobrega, M. P., Nobrega, F. G. and 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.
- Grant, C. M. (2001). Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol Microbiol* **39** (3): 533-541.
- Gutteridge, J. M. (1993). Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun* **19** (3): 141-158.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. 3. ed. New York: Oxford University Press Inc.
- Holdom, M. D., Hay, R. J. and Hamilton, A. J. (1996). The Cu,Zn superoxide dismutases of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, and *Aspergillus terreus*: purification and biochemical comparison with the *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase. *Infection Immun* **64**: 3326-3332.
- Hwang, C. S., Rhie, G. E., Oh, J. H., Huh, W. K., Yim, H. S. and 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. *Microbiol* **148**: 3705-3713.
- Izawa, S., Inoue, Y. and Kimura, A. (1996). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **320**: 61-67

- Jamieson, D. J. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J Bacteriol* **174**: 6678-6681.
- Jamieson, D. J., Stephen, D. W. and Terriere, E. C. (1996). Analysis of the adaptive oxidative stress response of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **138**: 83-88.
- Jamieson, D. J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 1511-1527.
- Kandror, O., Bretschneider, N., Kreydin, E., Cavalieri, D. and Goldberg, A. L. (2004) Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Mol Cell* **13** (6): 771-781.
- Kanematsu, S. and Asada, K. (1991). Chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-superoxide dismutase: their characteristic amino acid sequences. *Free Radic Res Commun* 12-13 Pt 1:383-390.
- Kanetsuna, F. and Carbonell, L. M. (1970). Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* **101** (3): 675-680.
- Kanetsuna, F., Carbonell, L. M., Moreno, R. E. and Rodriguez, J. (1969). Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* **97** (3): 1036-1041.
- Kaput, J., Goltz, S. and Blobel, G. (1982). Nucleotide sequence of the yeast nuclear gene for cytochrome c peroxidase precursor: functional implications of the pre-sequence for protein transport into mitochondria. *J Biol Chem* **257**: 15054-15058.
- Karthikeyan, G., Lewis, L. K. and Resnick, M. A. (2002). The mitochondrial protein frataxin prevents nuclear damage. *Hum Mol Genet* **11** (11): 1351-1362.
- Kashino, S. S., Fazioli, R. A., Cafalli-Favati, C., Meloni-Bruneri, L. H., Vaz, C. A., Burger, E., Singer, L. M. and 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.
- Klotz, M. G., Klassen, G. R. and Loewen, P. C. (1997). Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Mol Biol Evol* **14** (9): 951-958.
- Kretsinger, R. H. (1980). Structure and evolution of calcium-modulated proteins. *CRC Crit Rev Biochem* **8** (2): 119-174.
- Kwon, M., Chong, S., Han, S. and Kim, K. (2003). Oxidative stresses elevate the expression of cytochrome c peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1623**: 1-5.
- Liochev, S. I. and Fridovich, I. (2003). Reversal of the superoxide dismutase reaction revisited. *Free Radic Biol Med* **34** (7): 908-10.

- Loose, D. S., Stover, E. P., Restrepo, A., Stevens, D. A. and Feldman, D. (1983). Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **80**: 7659-7663.
- Lutz, A. (1908). Uma micose pseudococcídica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hifoblastomicoses americanas. *O Brazil-Medico* **22** (13,15): 121-124, 141-144.
- Lukas, T. J., Mirzoeva, S. and Watterson, D. M. (1998). Calmodulin regulated protein kinases. In: Van Eldik, L. J. and Watterson, D. M. (eds). *Calmodulin signal transduction*. New York: Academic Press. pp. 65–168.
- MacMicking, J., Xie, Q. W. and Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* **15**: 323-350.
- Marklund, S. L., Holme, E. and Hellner, L. (1982). Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta* **126** (1): 41-51.
- Marques, S. A. (2003). Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. *An. Bras. Dermatol.* **78** (2): 135-146.
- Martchenko, M., Alarco, A. M, Harcus, D. and Whiteway M. (2004). Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Mol Biol Cell* **15** (2): 456-567.
- Matute, D. R., McEwen, J. G., Puccia, R., Montes, B. A., San-Blas, G., Bagagli, E., Rauscher, J. T., Restrepo, A., Morais, F., Niño-Vega, G. and Taylor, J. W. (2006). Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* **23** (1): 65-73.
- McEwen, J. G., Garcia, A. M., Ortiz, B. L., Botero, S. and Restrepo, A. (1995). In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res* **26** (3): 305-306.
- Miller, R. A. and Britigan, B. E. (1997). Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev* **10** (1): 1-18.
- Missall, T. A., Lodge, J. K. and McEwen, J. E. (2004). Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryot Cell* **3** (4): 835-846.
- Moraitis, C. and Curran, B. P. (2004). Reactive oxygen species may influence the heat shock response and stress tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21** (4): 313-323.
- Molinari-Madlum, E. E., Felipe, M. S. and Soares, C. M. (1999). Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Med Mycol* **37** (4): 269-276.

- Montoya, A. E., Alvarez, A. L., Moreno, M. N., Restrepo, A. and McEwen, J. G. (1999). Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* **37** (3):219-222.
- Montoya, A. E., Moreno, M. N., Restrepo, A. and McEwen, J. G. (1997). Electrophoretic karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* **21** (2): 223-227.
- Moreira, S. F., Bailao, A. M., Barbosa, M. S., Jesuino, R. S., Felipe, M. S., Pereira, M. and de Almeida Soares, C. M. (2004). Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis. *Yeast* **21** (2): 173-182.
- Moscardi-Bacchi, M., Brummer, E. and Stevens, D. A. (1994). Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. *J Med Microbiol* **40** (3): 159-164.
- Murphy, L. M., Strange, R. W. and Hasnain, S. S. (1997). A critical assessment of the evidence from XAFS and crystallography for the breakage of the imidazolate bridge during catalysis in CuZn superoxide dismutase. *Structure* **5** (3): 371-379.
- Murphy, K. M. (1998). T lymphocyte differentiation in the periphery. *Curr Opin Immunol* **10** (2): 226-232.
- Narasipura, S. D., Ault, J. G., Behr, M. J., Chaturvedi, V. and Chaturvedi, S. (2003). Characterization of Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene knock-out mutant of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: role in biology and virulence. *Mol Microbiol* **47** (6): 1681-1694.
- Negróni, P. (1966). The *Paracoccidioides brasiliensis* lives saprophytically in the soil of Argentina. *Prensa Med Argent* **53** (39): 2381-2382.
- Nemecek, J. C., Wuthrich, M. and Klein, B. S. (2006). Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science* **312** (5773): 583-588.
- Nicola, A. M., Andrade, R. V. and Silva-Pereira, I. (2005). Molecular chaperones in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet Mol Res* **4** (2): 346-357.
- Niño-Vega, G. A., Calcagno, A. M., San-Blas, G., San-Blas, F., Gooday, G. W. and Gow, N. A. (2000). RFLP analysis reveals marked geographical isolation between strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* **38** (6): 437-441.
- Noventa-Jordão, M. A., Couto, R. M., Goldman, M. H., Aguirre, J., Iyer, S., Caplan, A., Terenzi, H. F. and Goldman, G. H. (1999). Catalase activity is necessary for heat-shock recovery in *Aspergillus nidulans* germlings. *Microbiol* **145**: 3229-3234.
- Ono, M. A., Itano, E. N., Mizuno, L. T., Mizuno, E. H. and Camargo, Z. P. (2002). Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by pesticides: is this a partial explanation for the difficulty in isolating this fungus from the soil? *Med Mycol* **40** (5): 493-499.

- Ookawara, T., Eguchi, H., Nishimura, M., Kizaki, T., Takayama, E., Saitoh, D., Ohno, H. and Suzuki, K. (2003). Effects of oxidative stress on the nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun* **303**: 914-919.
- Oury, T. D., Day, B. J. and Crapo, J. D. (1996). Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons. *Free Radic Biol Med* **20** (7): 957-965.
- Paris, S. and Duran, S. (1985). Cyclic adenosine 3',5' monophosphate (cAMP) and dimorphism in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* **92**: 115-120.
- Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A. and Caparrini, A. (1986). A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Anal. Biochem* **154**: 536-541.
- Perrino, B. A. and Soderling, T. R. (1998). Biochemistry and pharmacology of calmodulin-regulated phosphatase calcineurin. In: Van Eldik, L. J. and Watterson, D. M. (eds). *Calmodulin signal transduction*. New York: Academic Press. pp. 169–236.
- Puig, S. and Thiele, D. J. (2002). Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin Chem Biol* **6**: 171-180.
- Raeder, U. and Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol* **1**: 17-20.
- Radi, R., Cassina, A. and Hodara, R. (2002). Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem* **383** (3-4): 401-409.
- Reinoso, C., Niño-Vega, G., San-Blas, G. and Dominguez, A. (2005). Random sequencing of *Paracoccidioides brasiliensis* genes. *Med Mycol* **43** (8): 681-689.
- Restrepo, A. (1978). Paracoccidioidomycosis. *Acta Med. Colomb.* **3**: 33-66.
- Restrepo, A., Salazar, M. E., Cano, L. E., Stover, E. P., Feldman, D. and 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.
- Restrepo, A. (1985). The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia* **23**: 323-334.
- Restrepo, A., McEwen, J. G. and Castaneda, E. (2001). The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol* **39**: 233-241.
- Ricci, G., Mota, F. T., Wakamatsu, A., Serafim, R. C., Borra, R. C. and Franco, M. (2004). Canine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* **42** (4): 379-383.
- Ridnour, L. A., Thomas, D. D., Mancardi, D., Espey, M. G., Miranda, K. M., Paolocci, N., Feelisch, M., Fukuto, J. and Wink, D. A. (2004). The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol Chem* **385** (1): 1-10.

- Romani, L. (1997). The T cell response against fungal infections. *Curr Opin Immunol* **9** (4): 484-490.
- Rumbley, C. A. and Phillips, S. M. (1999). The schistosome granuloma: an immunoregulatory organelle. *Microbes Infect* **1** (7): 499-504.
- Salazar, M. E., Restrepo, A. and Stevens, D. A. (1988). Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun* **56** (3): 711-713.
- San-Blas, G. and Niño-Vega, G. (2001). *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In: Cihlar, R. L. and Calderone, R. A. (eds). *Fungal Pathogenesis: principles and clinical applications*. New York: Marcel Dekker. 762p.
- San-Blas, G., Niño-Vega, G. and Iturriaga, T. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* **40** (3): 225-242.
- San-Blas, G., Prieto, A., Bernabe, M., Ahrazem, O., Moreno, B. and Leal, J. A. (2005).  $\alpha$ -galf 1 $\rightarrow$ 6- $\alpha$ -mannopyranoside side chains in *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall are shared by members of the Onygenales, but not by galactomannans of other fungal genera. *Med Mycol* **43** (2): 153-159.
- Shechter, G. and Grossman, S. (1983) Lipoxygenase from baker's yeast: purification and properties. *Int. J. Biochem* **15**: 1295-1304.
- Siderius, M., Rots, E. and Mager, W. H. (1997). High-osmolarity signalling in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated in a carbon-source-dependent fashion. *Microbiology* **143** (10): 3241-3250.
- Sies, H. *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. (1993). London: Academic Press.
- Sigler, K., Chaloupka, J., Brozmanova, J., Stadler, N. and Höfer, M. (1999). Oxidative stress in microorganisms – I. *Folia Microbiol* **44** (6): 587-624.
- Silva, S. P., Felipe, M. S. S., Pereira, M., Azevedo, M. O. and Soares, C. M. A. (1994). Phase transition and stage-specific protein synthesis in the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exp Mycol* **18**: 294-299.
- Silva-Vergara, M. L., Martinez, R., Camargo, Z. P., Malta, M. H., Maffei, C. M. and Chadu, J. B. (2000). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. *Med Mycol* **38** (3): 193-199.
- Singer-Vermes, L. M., Ciavaglia, M. C., Kashino, S. S., Burger, E. and Calich V, L. (1992). The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* **30** (3): 261-264.
- Smith, M. W. and Doolittle, R. F. (1992). A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutase. *J Mol Evol* **34** (2): 175-184.

- Soares, C. M., Madlun, E. E., da Silva, S. P., Pereira, M. and Felipe, M. S. (1995). Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* **33** (2): 505-507.
- Sonnenburg, W. K., Wayman, G. A., Storm, D. R., Beavo, J. A. (1998). Cyclic nucleotide regulation by calmodulin. In: Van Eldik, L. J. and Watterson, D. M. (eds). *Calmodulin signal transduction*. New York: Academic Press. pp. 237-286.
- Souto, J. T., Figueiredo, F., Furlanetto, A., Pfeffer, K., Rossi, M. A. and Silva, J. S. (2000). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol* **156** (5): 1811-1820.
- Stover, E. P., Schar, G., Clemons, K. V., Stevens, D. A. and Feldman, D. (1986). Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun* **51**: 199-203.
- Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Beem, K. M., Richardson, J. S. and Richardson, D. C. (1982). Determination and analysis of the 2 Å structure of copper, zinc superoxide dismutase. *J Mol Biol* **160** (2): 181-217.
- Tan, R. J., Fattman, C. L., Watkins, S. C. and Oury, T. D. (2004). Redistribution of pulmonary EC-SOD after exposure to asbestos. *J Appl Physiol* **97** (5): 2006-2013.
- Tavares, A. H., Silva, S. S., Bernardes, V. V., Maranhão, A. Q., Kyaw, C. M., Poças-Fonseca, M. and Silva-Pereira, I. (2005). Virulence insights from the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet Mol Res.* **4** (2): 372-389.
- Ueom, J., Kwon, S., Kim, S., Chae, Y. and Lee, K. (2003). Acquisition of heat shock tolerance by regulation of intracellular redox states. *Biochim Biophys Acta* **1642**: 9-16.
- Valentine, J. S., Wertz, D. L., Lyons, T. J., Liou, L. L, Goto, J. J. and Gralla, E. B. (1998). The dark side of dioxygen biochemistry. *Curr Opin Chem Biol* **2** (2): 253-262.
- Vergara, M. L. and Martinez, R. (1998). Role of the armadillo *Dasyus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* **144** (3): 131-133.
- Walter, S. and Buchner, J. (2002). Molecular chaperones - cellular machines for protein folding. *Angew Chem Int Ed Engl* **41** (7):1098-1113.
- Wilson, R. B. and Roof, D. M. (1997). Respiratory deficiency due to loss of mitochondrial DNA in yeast lacking the frataxin homologue. *Nat Genet* **16** (4): 352-357.
- Wisnicka, R., Krzepilko, A., Wawryn, J., Krawiec, Z. and Bilinski, T. (1998). Protective role of superoxide dismutase in iron toxicity in yeast. *Biochem Mol Biol Int* **44** (3): 635-641.
- Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J. and Poole, L, B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* **28** (1): 32-40.

- Yonetani, T. and Ray, G. S. (1965). Studies on cytochrome c peroxidase. *J Biol Chem* **241**: 700-706.
- Yoo, H. Y., Kim, S. S. and Rho, H. M. (1999). Overexpression and simple purification of human superoxide dismutase (SOD1) in yeast and its resistance to oxidative stress. *J Biotechnol* **68**: 29-35.
- Zügel, U. and Kaufmann, S. H. (1999). Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* **12** (1): 19-39.