

**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Biologia Celular**  
**Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular**

**Perfil transcricional do fungo *Paracoccidioides* na interação com células pulmonares humanas (A549) - análise comparativa entre *P. brasiliensis* (Pb18) e *P. lutzii* (Pb01).**

**Adriane Alves de Oliveira**

Brasília - DF  
Março – 2010

#### Ficha catalográfica

Oliveira, Adriane Alves de

Perfil transcricional do fungo *Paracoccidioides* na interação com células pulmonares humanas (A549)- análise comparativa entre *P. brasiliensis* (Pb18) e *P. lutzii* (Pb01).

Adriane Alves de Oliveira – Brasília, 2010.

Orientadora: Maria Sueli Soares Felipe

Co-orientadora: Simoneide Souza Silva

79 p; 30 cm.

Dissertação de Mestrado (Biologia Molecular), Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas,

Universidade de Brasília – UNB.

1. Paracoccidioidomicose, interação patógeno-hospedeiro, pneumócitos humanos.

**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Biologia Celular**  
**Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular**

**Perfil transcricional do fungo *Paracoccidioides* na interação com células pulmonares humanas (A549) - análise comparativa entre *P. brasiliensis* (Pb18) e *P. lutzii* (Pb01).**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular.

Aluna: Adriane Alves de Oliveira  
Orientadora: Dra Maria Sueli Soares Felipe  
Co-Orientadora: Dra. Simoneide Souza Silva

Brasília-DF  
Março-2010

## **Banca examinadora**

### **Titulares:**

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Sueli Soares Felipe, Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

Prof.<sup>a</sup> Dra. Beatriz Dolabela de Lima, Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

Prof.<sup>a</sup> Dra. Larissa Fernandes Matos, Faculdade da Ceilândia, Universidade de Brasília

### **Suplente:**

Prof.<sup>a</sup> Dra. Sônia Nair Bão, Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho a toda a minha família, especialmente minha mãe e irmã que sempre me apoiaram na minha vida e na jornada acadêmica. Dedico também a todos os meus amigos de Brasília, que sempre estiveram ao meu lado nos bons e maus momentos, e são mais do que eu possa explicar nestas poucas linhas.

## **Agradecimentos**

Agradeço à minha mãe e minha irmã Rafaela que me ampararam por toda a minha vida, me incentivando a estudar na UnB e acreditando que eu realizaria minhas metas.

À prof.<sup>a</sup> Sueli que me deu a oportunidade de desenvolver este trabalho, confiou e acreditou na minha capacidade.

À Simoneide que sempre me ajudou desde a época de iniciação científica e teve bastante paciência para me orientar nos experimentos e na rotina do mestrado.

Aos meus amigos da Casa do Estudante pelos momentos em que se esforçaram para me fazer suportar a rotina pesada de experimentos. Em especial ao Luiz, Devs, Kyara, Érica, Fabiana, Fabrícia, Lauana, Rogério e Fred que sempre me acolheram nos fins de semana e feriados solitários.

À Larissa, Rhaul, Luciana, Cristhian, Mikael, Elaine, Mirian, Wélliton e todos os amigos da Biologia por todos os momentos de apoio, por toda amizade, por todos os crepes, enfim, por todos os ótimos momentos que passamos juntos.

À Aline, Val, Marquinhos e Catanduva por todas as longas noites de conversas no Msn que tornaram as semanas muito mais alegres.

À Larissa, Hugo, Lucas, Marcus T., André A., Camila, Marinez, Maranda, Daiana, Marcus Vinícius, Marilen, José Carlos, Ana Karina, Alex, Erika, Luísa, Nágila, Patrícia, Laura, Walter, Lorena, Thiago, Fátima, Ivonildes e todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular e do Laboratório de Patologia Molecular que me ajudaram quando precisei e fizeram com que a vida de mestranda fosse muito mais agradável.

À Izabel, Calliandra, Eveline e André Jaborandy que muito me ajudaram na vida pessoal e na rotina do laboratório tornando os dias muito mais divertidos.

Agradeço também aos professores do Departamento de Biologia Celular que me auxiliaram quando precisei e contribuíram para minha formação acadêmica através das disciplinas cursadas durante o mestrado. À Ana, da Secretaria de Pós-graduação, que me atendeu sempre que necessitei.

Ao CNPq que financiou minha bolsa de mestrado e permitiu minha estada em Brasília nestes dois anos.

# Índice

<b>Lista de figuras</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de tabelas</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de abreviaturas e siglas</b> .....	<b>X</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>XIV</b>
<b>1) Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1) O gênero <i>Paracoccidioides</i> e a paracoccidioidomicose .....	1
1.2) Reconhecimento molecular na interação patógeno - hospedeiro .....	8
<b>2) Justificativa</b> .....	<b>14</b>
<b>3) Objetivos</b> .....	<b>15</b>
3.1) Objetivo geral.....	15
3.2) Objetivos específicos .....	15
<b>4) Materiais e Métodos</b> .....	<b>16</b>
4.1) O isolado fúngico e as condições de cultura .....	16
4.2) Cultivo da linhagem A549 de pneumócitos humanos em cultura .....	16
4.3) Infecção dos pneumócitos humanos em cultura com leveduras de <i>P. lutzii</i> (Pb01) para análise por microscopia óptica da cinética de infecção.....	16
4.4) Contagem de UFCs (unidades formadoras de colônia) de <i>P. lutzii</i> .....	17
4.5) Infecção dos pneumócitos humanos em cultura com leveduras de <i>P. lutzii</i> e <i>P. brasiliensis</i> para extração do RNA total do fungo .....	17
4.6) Extração do RNA total de leveduras de <i>Paracoccidioides</i> internalizadas .....	18
4.7) Microarranjos de cDNA em lâminas de vidro .....	19
a) Obtenção do RNA total de referência (pool) .....	19
b) Preparação dos microarranjos de cDNA em lâminas de vidro .....	20
c) Marcação das sondas de cDNA com os fluorocromos Cy3 e Cy5.....	20
- Preparação da primeira fita de cDNA por incorporação de AAdUTP.....	21
- Incorporação de Cy3 e Cy5.....	21
-Quantificação do CyDye incorporado no cDNA .....	21
d) Hibridação das lâminas com os microarranjos.....	22
e) Aquisição das imagens dos microarranjos .....	23
f) Análise dos Dados .....	23
g) Detecção de genes diferencialmente expressos.....	23
4.8) Desenho de oligonucleotídeos para PCR em tempo real .....	24
4.9) Tratamento do RNA total com DNase I. ....	25
4.10) Síntese de cDNA .....	25
4.11) PCR em tempo real de genes diferencialmente expressos.....	25
<b>5) Resultados</b> .....	<b>27</b>
5.1) Cinética de adesão/internalização de leveduras de <i>P. lutzii</i> por pneumócitos humanos em cultura.....	27
5.2) Análise em gel de agarose do RNA total extraído de <i>P. lutzii</i> internalizado.....	28
5.3) Microarranjos de cDNA em lâminas de vidro .....	29
5.4) Análise da expressão gênica de <i>Paracoccidioides</i> após internalização por pneumócitos humanos .....	30

5.5) Análise comparativa da expressão gênica de <i>P. lutzii</i> (Pb01) e de <i>P. brasiliensis</i> (Pb18) após internalização por pneumócitos humanos.....	34
<b>6) Discussão.....</b>	<b>41</b>
Análise comparativa da expressão gênica entre os isolados Pb01 e Pb18 relacionada à:	
6.1) Metabolismo de carboidratos.....	41
6.2) Parede celular.....	42
6.3) Resposta ao estresse oxidativo.....	43
<b>7) Conclusões e perspectivas .....</b>	<b>45</b>
<b>8) Referências Bibliográficas .....</b>	<b>46</b>
<b>9) Anexos.....</b>	<b>61</b>

## **Lista de figuras**

Figura 1- página 28

Figura 2- página 29

Figura 3- página 38

Figura 4- página 39

Figura 5- página 40

## **Lista de tabelas**

Tabela 1- página 62

Tabela 2- página 67

Tabela 3- página 74

Tabela 4- página 32

Tabela 5- página 33

Tabela 6- página 35

Tabela 7- página 36

## **Lista de abreviaturas e siglas**

%- percentagem

A549- linhagem de pneumócitos humanos

A80- polímero poli adenina 5' - trifosfato

AAdUTP- aminoalil dUTP

ATCC- American Type Culture Collection

ATP- adenina 5'-trifosfato

BHI- brain heart infusion

cDNA- DNA complementar

cm- centímetro

cm<sup>2</sup>- centímetros quadrados

CO<sub>2</sub>- dióxido de carbono

CR3- receptor de complemento 3

Cy3- fluorocromo cianina 3

Cy5- fluorocromo cianina 5

CyDye- corante cianina

DDT- ditiotreitól

DNA- ácido desoxirribonucléico

DNase- desoxirribonuclease

dNTP- desoxirribonucleotídeo

dT- desoxitimidina

EDTA- ácido etilenodiaminotetracético

ELISA- enzyme linked immunosorbent assay

EROs- espécies reativas de oxigênio

FDR- false discovery rate

g- grama

GTC- isotiocianato de guanidina

h- hora

H<sub>2</sub>O- água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- peróxido de oxigênio

HEPES- N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico  
Hsp- proteína de choque térmico  
ICAM-1- intercellular adhesion molecule-1  
IFN- $\gamma$ - interferon gama  
IL-6- interleucina 6  
IL-8 interleucina 8  
J774- linhagem de macrófagos peritoneais murinos  
kDa- quiloDalton  
KOH- hidróxido de potássio  
L- litro  
M- molar  
Mb- megabase  
MCP-1- monocyte chemoattractant protein-1  
MEC- matriz extracelular  
mg-miligrama  
MH-S- linhagem de macrófagos alveolares murinos  
min- minuto  
mJ- miliJoule  
mL- mililitro  
mM- milimolar  
M-molar  
mol- quantidade de matéria  
NaOH- hidróxido de sódio  
NHS- N-hidroxisuccinimida  
nL- nanolitro  
nm- nanômetro  
NO- óxido nítrico  
°C- grau Celsius  
p/v- peso por volume  
Pb- *Paracoccidioides brasiliensis*  
PCM- paracoccidioidomicose

PCR- reação em cadeia da polimerase  
pH- potencial hidrogeniônico  
RGD- arginina-glicina-aspartato  
RNA- ácido ribonucléico  
RNAm- RNA mensageiro  
RNase- ribonuclease  
RNAr- RNA ribossômico  
rpm- rotações por minuto  
s- segundo  
SAM- Significance Analysis of Microarray  
SDS- dodecil sulfato de sódio  
SEM- erro padrão da média  
SFB- soro fetal bovino  
SSC- tampão citrato de sódio  
TNF- $\alpha$ - tumor necrosis factor alfa  
U- unidade enzimática  
UFC- unidade formadora de colônia  
UTP- uridina 5'-trifosfato  
v/v- volume por volume  
 $\mu$ g- micrograma  
 $\mu$ L- microlitro  
 $\mu$ m- micrômetro

## Resumo

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica humana causada por espécies do fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides*. Até há pouco tempo, apenas a espécie *P. brasiliensis* era reconhecida dentro deste gênero, mas recentemente foi identificada a espécie *P. lutzii*, filogeneticamente distante da anterior. A infecção é adquirida provavelmente pela inalação de propágulos transportados pelo ar derivados da forma miceliana do fungo e que se alojam principalmente nos pulmões. Vários estudos sugerem que o parasitismo intracelular do fungo seja importante na colonização do hospedeiro e na disseminação da doença. Para avaliar essa hipótese foi analisado comparativamente o perfil transcricional de *Paracoccidioides* - *P. brasiliensis* (Pb18) e *P. lutzii* (Pb01) recuperados do interior de pneumócitos humanos em cultura (A549) durante uma cinética de interação. Para tanto foi utilizada a técnica de microarranjos de cDNA no caso de *P. lutzii* e PCR em tempo real para os representantes das duas espécies. Os genes diferencialmente expressos identificados neste trabalho estão relacionados principalmente à limitação de glicose, resposta ao estresse oxidativo, remodelagem da parede celular e adesão aos tecidos do hospedeiro. Os resultados demonstram que de uma forma semelhante ao que ocorre no interior de macrófagos murinos peritoniais, *Paracoccidioides* apresenta uma plasticidade transcricional para sobreviver no microambiente de pneumócitos humanos, que de forma geral é semelhante entre as espécies analisadas.

## Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a human systemic mycosis caused by the thermal-dimorphic fungus *Paracoccidioides*. Until recently, *P. brasiliensis* was recognized as the only species inside this genus, nevertheless last year *P. lutzii* was acknowledged as new specie phylogenetically distant from the former. The infection is acquired by the inhalation of propagules derived from the mycelium form of the fungus and establishes itself mainly in the lungs. Various studies suggest that the intracellular parasitism of this fungus is relevant in the host's colonization and the dissemination of the disease. In order to evaluate this hypothesis a comparative transcriptional profile between *P. brasiliensis* (Pb18) and *P. lutzii* (Pb01) obtained from the interior of human pneumocytes lineage (A549), during the interaction kinetics, was analysed. For this objective, cDNA microarray was used for *P. lutzii* (Pb01) and Real Time PCR for the representatives of both species of *Paracoccidioides* (Pb18 and Pb01). The genes identified by this study as differentially expressed were related mostly to glucose limitation, oxidative stress response, cell wall remodelling and adhesion to host's tissues. Our results demonstrated that, in a similar manner in which occurs inside peritoneal murine macrophages, *Paracoccidioides* displays a transcriptional plasticity to survive in the microenvironment of the human pneumocytes, which is alike between both species analysed.

# 1. Introdução

## 1.1. O gênero *Paracoccidioides* e a paracoccidioidomicose

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica humana causada por espécies do fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides*. A PCM é endêmica das Américas Central e do Sul, sendo que os países com maior incidência são o Brasil, Venezuela e Colômbia (Brummer *et al.*, 1993). Até há pouco tempo, apenas a espécie *P. brasiliensis* era reconhecida dentro deste gênero. Este é um fungo termo-dimórfico, encontrado na forma miceliana a 22°C e na forma leveduriforme a 37°C. A infecção é adquirida provavelmente pela inalação de propágulos transportados pelo ar derivados da forma miceliana do fungo e que se alojam principalmente nos pulmões (Franco *et al.*, 1993; Restrepo *et al.*, 2001; Coutinho *et al.*, 2002). Nestes órgãos, o fungo sofre a transição dimórfica, um evento fundamental para o estabelecimento da infecção, que pode ser erradicada, contida em um granuloma ou se disseminar para o restante do corpo, dependendo da resposta imune do hospedeiro e da virulência do fungo (Franco, 1987; San-Blas *et al.*, 2002).

A relevância do dimorfismo para a patogênese fúngica e doenças infecciosas é demonstrada por muitas linhas de evidência. Primeiramente, muitos fungos patogênicos para humanos apresentam dimorfismo, geralmente possuindo morfotipos patogênico e não-patogênico. Segundo, há uma quantidade de fungos patogênicos para plantas (como por exemplo, *Ustilago maydis*) que são dimórficos, apresentando morfotipos patogênico e não-patogênico, o que enfatiza a utilidade adaptativa da morfogênese como uma forma de parasitar o hospedeiro, sendo humano, animal ou vegetal. Terceiro, observa-se que a habilidade de um fungo patogênico sofrer transição dimórfica é essencial para a patogênese e para o sucesso no estabelecimento da infecção. Finalmente, há gêneros de fungos compostos principalmente por espécies monomórficas (ex. *Penicillium*), mas com um ocasional membro dimórfico (*Penicillium marneffeii*) que é a única espécie dimórfica do gênero citado que provoca doença sistêmica em humanos. Com isso, o dimorfismo fúngico e a morfogênese mostram-se claramente essenciais ou fortemente correlacionadas com a habilidade de provocar doença em humanos (Woods, 2002). A patogenicidade está intimamente relacionada com a transição dimórfica, desde que

isolados de *P. brasiliensis* incapazes de se diferenciar em levedura são avirulentos (San-Blas *et al.*, 2001).

Embora o contato com *P. brasiliensis* seja essencialmente o mesmo para ambos os sexos, a PCM é de 13 a 87 vezes mais comum em homens que em mulheres. Receptores para 17- $\beta$ -estradiol foram detectados no citosol de micélio e levedura de *P. brasiliensis*, e estudos mostraram que este hormônio feminino inibe a transição dimórfica, mas não afeta o crescimento da levedura ou a multiplicação da mesma (Restrepo *et al.*, 1984; Stover *et al.*, 1986, Salazar *et al.*, 1988; Aristizbal *et al.*, 1998), o que pode explicar a maior incidência de PCM em homens.

Duas formas clínicas da PCM foram identificadas: forma aguda (ou sub-aguda) e forma crônica. A forma aguda também é conhecida como juvenil e é a forma mais severa. É caracterizada por um curso rápido (semanas a meses) e pelo envolvimento do sistema reticuloendotelial (baço, fígado, linfonodos, medula óssea). A função imune mediada por célula é muito comprometida nesses pacientes, a maioria deles sendo crianças e jovens. Nessa forma da doença o pulmão frequentemente é o foco primário. A forma crônica, também conhecida como forma adulta ocorre em 90% dos pacientes, sendo a maioria deles indivíduos do sexo masculino. A doença progride de forma mais lenta e pode levar meses ou anos para se estabelecer. Em aproximadamente 25% dos casos, os pulmões (raramente outros órgãos) são os únicos órgãos clinicamente afetados (forma unifocal). Entretanto, em outros casos, a infecção ocorre primariamente nos pulmões a partir do qual se dissemina via corrente sanguínea e/ou sistema linfático para outros órgãos e sistemas caracterizando a forma disseminada da PCM (forma multifocal) (Brummer *et al.*, 1993; Franco *et al.*, 1987).

Na fase de levedura, as colônias são macias, enrugadas e cor creme. As colônias são compostas de células leveduriformes de diferentes tamanhos (4 a 30  $\mu$ m), normalmente de ovais a alongadas e têm uma espessa parede celular refrátil e um citoplasma que contém proeminentes gotículas lipídicas (Brummer *et al.*, 1993). As células leveduriformes são multinucleadas e multiplicam-se por brotamentos polares laterais. Os brotamentos são conectados à célula-mãe por estruturas estreitas, dando a toda a estrutura a aparência de roda em leme, sendo esta a mais importante característica morfológica e para o diagnóstico de *P. brasiliensis*. A fase miceliana se desenvolve lentamente à

temperatura ambiente, sendo caracterizada por uma estrutura filamentosa (hifa) septada com comprimento de 1-3  $\mu\text{m}$  (Brummer *et al.*, 1993; Carbonell, 1969).

O fungo *P. brasiliensis* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, subdivisão Euascomycete, classe Plectomycete, subclasse Euascomycetidae, ordem Onygenales, família Ajellomycetaceae, gênero *Paracoccidioides*, espécie *Paracoccidioides brasiliensis*. Em 2004, Untereiner *et al.*, baseados em estudos morfológicos, similaridades fisiológicas e dados moleculares descreveram a família Ajellomycetaceae. Os fungos deste clado são saprófitas, dimórficos, patogênicos e são associados a vertebrados. Além disso, os membros dessa família possuem ascomata globosa e carecem de atividade queratinolítica. A família Ajellomycetaceae, considerada um clado distinto da família Onygenaceae compreende *Ajellomyces* (gêneros *Blastomyces*, *Emmonsia* e *Histoplasma*) e *Paracoccidioides brasiliensis*.

Desde a sua descrição em 1908 por Adolf Lutz, o fungo *P. brasiliensis* vinha sendo considerado como uma espécie única, no entanto existe uma grande diversidade genética entre diferentes isolados do fungo, além de existir uma grande variação nos níveis de virulência desses isolados em modelos experimentais estabelecidos (Singer-Vermes *et al.*, 1989). Matute *et al.* (2006) descreveram a existência de três diferentes espécies filogenéticas de *P. brasiliensis*: S1 (grupo parafilético formado por 38 isolados provenientes da Argentina, Brasil, Peru, Venezuela e Antártida), PS2 (contém 6 isolados, cinco dos quais provenientes do Brasil e um da Venezuela) e PS3 (contém 21 isolados colombianos). Recentemente, Teixeira *et al.* (2009) identificaram um clado composto por 17 isolados geneticamente similares, incluindo o isolado Pb01, distintos do clado S1/PS2/PS3 utilizando o método de reconhecimento de espécies por concordância genealógica (GCPSR). Estes autores propõem que tal clado denominado “*Pb01-like*” seja considerado uma nova espécie denominada *Paracoccidioides lutzii*. Em um estudo recente, Fraga (2008) observou que leveduras do isolado Pb01 apresentam um menor tamanho e uma parede celular mais espessa em relação a leveduras do isolado Pb18 de *P. brasiliensis*. Além disso, determinou-se que tanto as células-mãe quanto os brotamentos de leveduras de Pb01 possuem um menor diâmetro e predominantemente formato circular comparadas com leveduras do isolado Pb18 que apresentam maiores diâmetros e forma variando de circular a elíptica. Este mesmo trabalho demonstrou que tais

diferenças morfológicas influenciaram a interação de leveduras de Pb01 com macrófagos alveolares murinos da linhagem MH-S. Estes últimos fagocitaram de forma mais rápida e em maior quantidade as leveduras de Pb01 e, além disso, houve uma maior produção de NO por macrófagos infectados por esse isolado quando comparados com aqueles infectados com o isolado Pb18. O isolado Pb01 induziu nos animais experimentais utilizados no referido estudo uma resposta imunológica mais efetiva, possivelmente devido a sua característica de ser mais imunogênico que Pb18. Desta maneira, o isolado Pb01 possui uma menor patogenicidade em relação ao isolado Pb18. Estes dados sobre o isolado Pb01 corroboram as pesquisas sobre a nova espécie críptica *P. lutzii*, que pode ser facilmente distinguido de *P. brasiliensis* por um grande número de polimorfismos e marcadores moleculares específicos (Teixeira *et al.*, submetido). Portanto, os dados gerados por estes trabalhos abrem caminho para estudos comparativos entre as espécies *P. lutzii* e *P. brasiliensis*, o que pode representar uma inovação no desenvolvimento de técnicas de diagnóstico e no tratamento da PCM.

Até o presente momento não se sabe ao certo qual a ploidia de *P. brasiliensis*. Montoya *et al.* (1997 e 1999) analisaram isolados ambientais e clínicos de *P. brasiliensis* sugerindo a existência de 5 cromossomos variando de 3,2 a 10 Mb e com tamanho do genoma estimado em aproximadamente 30 Mb para ambos os tipos de isolados. Posteriormente, Feitosa *et al.* (2003), analisaram 12 isolados clínicos e ambientais provenientes de diferentes áreas geográficas por meio de eletroforese em campo pulsado e hibridização do DNA. Esses autores sugerem a existência de isolados aneuplóides, haplóides e diplóides e propõem ainda que a variação na quantidade de núcleos na célula leveduriforme poderia explicar algumas dessas variações no conteúdo de DNA. Recentemente, Almeida *et al.* (2007) analisaram o ciclo celular de 10 isolados clínicos e ambientais por meio da técnica de citometria de fluxo e observaram um genoma de tamanho estimado de 26 a 35 Mb por célula leveduriforme uninucleada. Além disso, esses autores observaram que os isolados se encontravam na forma haplóide ou aneuplóide não sendo relatada nenhuma associação entre tamanho do genoma/ploidia e características clínico-epidemiológicas dos isolados estudados. Recentemente, os genomas dos isolados Pb01, Pb3 (pertencente à espécie filogenética PS2) e Pb18 (pertencente à espécie filogenética S1) foram sequenciados pelo Broad Institute-USA em

colaboração com grupos que trabalham com *P. brasiliensis* e foram calculados em 32,94 Mb, 29,06 Mb e 29,95 Mb, respectivamente para cada isolado ([http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis/GenomeStats.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/GenomeStats.html)).

Recentemente alguns trabalhos têm relatado a presença de transcritos relacionados a processos de reprodução sexual deste patógeno. Felipe *et al.* (2005) identificaram no transcriptoma do isolado Pb01 de *P. brasiliensis* os fatores de transcrição *MAT*, *MCMI* e *NsdD* relacionados à reprodução sexuada em membros do filo Ascomycota. Ainda neste mesmo trabalho foram identificaram os transcritos *Ste4*, *Ste20*, *Ste11*, *Ste7*, *Kss1/Fus3/Cek* e *Ste12* relacionados à via de ativação de feromônios do mating no transcriptoma de *P. brasiliensis*, o que representa uma forte evidência de mating nesse fungo. Posteriormente, Matute *et al.* (2006) identificaram três espécies crípticas de *P. brasiliensis*, decorrentes de dois eventos independentes de especiação. Em pelo menos uma dessas espécies filogenéticas, identificada como S1, observou-se a presença de recombinação. Com isso, há fortes evidências moleculares para a reprodução sexuada em *P. brasiliensis*, mas até o momento ainda não foi determinada a fase teleomórfica (sexual) de *P. brasiliensis* (Felipe *et al.*, 2005; Matute *et al.*, 2006).

Análises morfológicas e ultraestruturais de *P. brasiliensis* revelam a composição da parede e sua correlação com a virulência entre diferentes isolados deste fungo. Kashino *et al.* (1985 e 1987) analisaram 10 isolados de *P. brasiliensis* na forma leveduriforme e mostraram por meio de microscopia eletrônica que havia similaridade ultra-estrutural entre os isolados, sendo que a parede celular se apresentava na forma de duas subcamadas elétron-densas. A parede celular de *P. brasiliensis* varia em termos de composição de acordo com a fase morfológica analisada, principalmente em relação aos carboidratos constituintes, que constituem mais de 80% do peso seco (San-Blas *et al.*, 1984; Kanetsuna *et al.*, 1972). É composta por proteínas e carboidratos, sendo que  $\beta$ -1,3-glicana e quitina são polissacarídeos recorrentes na composição de parede celular no Reino Fungi (Bartnicki-Garcia, 1968),  $\alpha$ -1,3-glicana possui ocorrência infrequente, sendo encontrada também em *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis* (San-Blas *et al.*, 2002). A quitina é comum em

ambas as fases, embora seja três vezes mais abundante na fase leveduriforme. Os polímeros de glicose são encontrados principalmente como  $\alpha$ -1,3-glicana na parede da fase leveduriforme (95%), além de uma pequena quantidade (5%) de  $\beta$ -1,3-glicana, sendo a última o único polímero encontrado na parede da forma miceliana. A  $\alpha$ -1,3-glicana é importante polímero encontrado especificamente na fase leveduriforme nas relações parasito-hospedeiro em *P. brasiliensis* (San-Blas *et al.*, 1982, 1984, 1986). Diversos trabalhos têm demonstrado que a  $\alpha$ -1,3-glicana pode ser um importante fator de virulência em *P. brasiliensis*. A virulência de diferentes isolados é proporcional ao conteúdo de  $\alpha$ -1,3-glicana na parede, sendo que isolados altamente virulentos chegam a ter grandes quantidades (~40% da parede celular da levedura) desse polissacarídeo e isolados pouco virulentos possuem baixas quantidades (3-5%) desse composto (San-Blas & San-Blas, 1977; Hallak *et al.*, 1982). Observa-se também que o cultivo *in vitro* por longos períodos de tempo de isolados virulentos leva a uma diminuição na quantidade de  $\alpha$ -1,3-glicana e perda de virulência e a localização na camada mais externa da parede do fungo sugere um papel de proteção contra fagócitos (Kanetsuna e Carbonell, 1970; San-Blas & San-Blas, 1977). Rappleye *et al.* (2004) demonstraram pela primeira vez que a  $\alpha$ -1,3-glicana é um importante fator de virulência para *Histoplasma capsulatum*, ao usarem a técnica de RNA interferente para silenciar o gene *ags* (codifica a  $\alpha$ -1,3-glicana sintase). Esses autores observaram uma maior susceptibilidade à destruição *in vitro* por macrófagos e uma diminuição na colonização de pulmões de hospedeiros murinos após infecção via nasal. Recentemente, Rappleye *et al.* (2007) mostraram que em células leveduriformes de *H. capsulatum* a  $\alpha$ -1,3-glicana sintase está presente na camada mais externa da parede celular e que contribui para a patogênese ocultando as  $\beta$ -glicanas imunoestimulatórias da detecção pelas células fagocíticas do hospedeiro. Esses autores também demonstraram nesse trabalho que a produção da citocina pro-inflamatória TNF- $\alpha$  pelos fagócitos é suprimida pela presença da camada de  $\alpha$ -1,3-glicana ou pelo silenciamento através de RNA interferente da dectina, receptor de  $\beta$ -1,3-glicana. A  $\beta$ -1,3-glicana é uma potente molécula imunoestimulatória que induz a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos, potencializando a resposta inflamatória e a eliminação do patógeno (Figueiredo *et al.*, 1993). Esse é um mecanismo através do qual as células

leveduriformes de *H. capsulatum* evadem do sistema imune do hospedeiro, já que uma baixa resposta imune celular permite a sobrevivência do patógeno, juntamente com sua instalação e multiplicação no hospedeiro. Vários autores observaram que o isolado pouco virulento Pb265 induz uma alta produção de TNF- $\alpha$  e uma aumentada quimiotaxia para neutrófilos comparado com o isolado muito virulento Pb18, o que pode estar associado às grandes quantidades de  $\beta$ -1,3-glicana expostas na parede celular de isolados pouco virulentos (Alves *et al.*, 1987, Figueiredo *et al.*, 1993, Silva *et al.*, 1994).

A identificação de genes relacionados ao dimorfismo poderia fornecer uma forma de potencial tratamento da doença, seja de forma preventiva (vacinas) ou de forma terapêutica (desenvolvimento de drogas). A identificação de genes transcritos especificamente em um dos morfotipos fornece informações importantes relacionadas com a regulação da morfogênese, síntese de parede celular e vias de transdução de sinal relacionadas com o controle da transição dimórfica. Nesse contexto, nosso laboratório estuda há vários anos genes diferencialmente expressos durante o dimorfismo de *Paracoccidioides*. A fim de se obter uma descrição molecular rápida e abrangente dos dois morfotipos do fungo, o Projeto Genoma Funcional e Diferencial de *Paracoccidioides brasiliensis* (MCT/CNPq) foi desenvolvido em nosso laboratório junto a 11 instituições da região Centro-Oeste do Brasil (Felipe *et al.*, 2003, 2005). Esse projeto teve como objetivo mapear o transcriptoma das formas micélio e levedura de *P. brasiliensis in vitro*. Foram identificadas 6.022 sequências transcritas no isolado Pb01, que correspondem a aproximadamente 80% do genoma estimado do fungo e utilizando as categorias funcionais MIPS, 2.931 PbESTs foram classificadas em 12 categorias funcionais. Essas categorias são: metabolismo celular; transcrição; síntese de proteínas; processamento e endereçamento de proteínas; energia; ciclo celular e processamento de DNA; transporte celular; transporte de íons e macromoléculas; comunicação celular e mecanismo de transdução de sinal; controle da organização celular; reparo celular, defesa e virulência e destino celular. Goldman e colaboradores (2003) identificaram 4.692 sequências transcritas do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* que foram funcionalmente categorizadas de acordo com a similaridade com genes já conhecidos. Recentemente, Tavares *et al.* (2007), utilizando a tecnologia de microarranjos de cDNA avaliaram a resposta transcricional inicial de leveduras de *P. brasiliensis* ao ambiente de macrófagos

peritoniais murinos. Neste trabalho, 1.152 genes foram analisados, sendo que 152 foram diferencialmente expressos pelo fungo após 6 horas de interação com macrófagos em cultura e associados à limitação de glicose e aminoácidos, construção da parede celular e estresse oxidativo. Em paralelo, Silva *et al.* (2008) analisaram o perfil transcricional de macrófagos peritoneais murinos durante uma cinética de infecção por *P. brasiliensis*, observando um aumento na transcrição de moléculas pró-inflamatórias codificando proteínas de membrana e metaloproteases envolvidas na adesão e fagocitose. Em um recente trabalho Derengowski *et al.* (2008) analisaram leveduras de *P. brasiliensis* crescidas em meio contendo acetato como única fonte de carbono e leveduras recuperadas de macrófagos da linhagem J774 em nove horas de co-cultivo e observaram em ambos os casos a indução de genes que codificam para enzimas do ciclo do glioxalato (*icl* e *mls*), mostrando que provavelmente o patógeno modula sua expressão gênica para utilizar compostos de 2 carbonos para a síntese *de novo* de glicose via gliconeogênese e sugerindo que o ciclo do glioxilato é uma importante via metabólica adaptativa para o fungo. Recentemente, Fernandes *et al.* (2008) caracterizaram os genes *ras* em *P. brasiliensis*, sendo identificados os genes *ras1* e *ras2* que codificam 2 proteínas diferentes com alta identidade entre si. Estes autores sugerem que estes genes estejam envolvidos no dimorfismo, resposta ao choque térmico e na interação de *P. brasiliensis* com a célula hospedeira. Utilizando a técnica de análise de diferença representacional (RDA-cDNA), Bailão *et al.* (2007) analisaram genes diferencialmente expressos de *P. brasiliensis* quando incubado *in vitro* com sangue humano, mimetizando a rota hematológica de disseminação do patógeno. Neste trabalho, foram observados transcritos positivamente modulados pelo fungo predominantemente relacionados à degradação de ácidos graxos, síntese de proteínas, sensoramento de variações na osmolaridade, remodelamento de parede celular e defesa celular.

## **1.2. Reconhecimento molecular na interação patógeno - hospedeiro**

O reconhecimento do patógeno e a sua adesão aos tecidos do hospedeiro é uma etapa crucial para a progressão da infecção. Adesão implica que o patógeno reconheça ligantes protéicos ou glicídicos na superfície da célula hospedeira ou reconheça constituintes das membranas basais que nutrem epitélios e endotélios, tais como

laminina, colágeno e fibronectina. O pulmão possui uma membrana basal alveolar que se localiza entre as células epiteliais alveolares e as células endoteliais alveolares (Patti *et al.*, 1994).

A matriz extracelular (MEC) é uma mistura complexa composta por macromoléculas que além de ter função estrutural, também afetam profundamente a fisiologia de um organismo (Hay, 1991). A matriz extracelular está intimamente relacionada a processos como adesão celular, migração, proliferação e diferenciação. Interações entre células eucarióticas e elementos da MEC são mediadas por receptores celulares, dos quais a integrina é a mais bem caracterizada. Membros dessa família de receptores são compostos por 2 subunidades ( $\alpha$  e  $\beta$ ) e ligam vários tipos de proteínas da MEC ao citoesqueleto, o que provavelmente influencia nos mecanismos de comunicação celular (Ruoslahti, 1991).

Microrganismos podem utilizar os componentes da MEC do hospedeiro para se disseminar. Algumas bactérias intracelulares parecem usar integrinas para invadir células hospedeiras e muitos vírus utilizam proteoglicanas associadas ao hospedeiro (Patti *et al.*, 1994). Proteínas bacterianas envolvidas na ligação à integrina incluem pertactina (Leininger *et al.*, 1991) e hemaglutinina filamentosa (Reiman *et al.*, 1990) de *Bordetella pertussis* e invasina de *Yersinia pseudotuberculosis* (Isberg *et al.*, 1987). A sequência peptídica arginina-glicina-aspartato (RGD) media a interação de pertactina com integrinas da célula hospedeira (Leininger *et al.*, 1991 e 1992). Esta sequência é também funcional em muitos componentes da MEC do hospedeiro como um sítio de reconhecimento específico para muitos tipos de integrinas. A hemaglutinina filamentosa, uma outra molécula que contém a sequência RGD liga-se à integrina CR3 (CD11b/CD18) presente em macrófagos humanos (Patti *et al.*, 1994). Vários trabalhos mostram que elementos da matriz extracelular, como fibronectina, colágenos, heparan sulfato e laminina são importantes na adesão de diversos tipos de microrganismos a células hospedeiras.

A fibronectina é uma glicoproteína dimérica ligada por pontes dissulfeto de 440 kDa encontrada na matriz extracelular e fluidos corporais de animais. Foi a primeira proteína de matriz observada agindo como um substrato para a adesão de células eucarióticas. *Candida albicans* é um patógeno fúngico que se liga a fibronectina (Klotz *et al.*, 1991),

assim como as bactérias *Treponema denticola*, *Mycobacterium bovis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Staphylococcus aureus* (Patti *et al.*, 1994).

Colágenos são os principais componentes da matriz extracelular e já foi caracterizada uma proteína de ligação a colágeno presente em *S. aureus* (Patti *et al.*, 1994). *Streptococcus pyogenes* isolados de pacientes com glomerulonefrite aguda mostraram de moderada a alta afinidade por colágeno tipo IV (Kostrzynska *et al.*, 1989). Cepas mutantes de *Yersinia* em que a região de ligação a colágeno da adesina YadA foi deletada apresentaram uma virulência 100 vezes menor quando comparada com a cepa parental em um modelo murino, indicando que esta proteína e sua atividade de ligação a colágeno provavelmente tenham uma importante função no processo infeccioso (Tarkkanen *et al.*, 1990).

Laminina é uma glicoproteína de 850 kDa, presente nas membranas basais, com a capacidade de promover adesão celular, diferenciação, forma e motilidade. Receptores específicos para laminina presentes na superfície de células normais, tumorais ou de microrganismos patogênicos auxiliam nessas funções. Esta glicoproteína pode estar exposta após danos ao tecido resultantes de processos inflamatórios ou de atividade lítica de toxinas ou drogas bacterianas (Hamilton *et al.*, 1998). Receptores de laminina foram relatados em células que normalmente interagem com membranas basais, tais como células epiteliais, endoteliais, musculares e neuronais. Células que migram dos vasos sanguíneos (macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e células provenientes de tumores humanos ou animais) podem também exibir estes receptores (Bouchara *et al.*, 1997). Foi demonstrado que a laminina presente na matriz extracelular reforça a adesão de leveduras de *P. brasiliensis* à superfície de células renais caninas Madin-Darby *in vitro* e que a glicoproteína gp43, presente na superfície do fungo é responsável por essa adesão (Vicentini *et al.*, 1994). A injeção de leveduras de *P. brasiliensis* cobertas com laminina em testículos de hamsters reforçaram a virulência do fungo, resultando em uma doença granulomatosa mais severa e de evolução mais rápida, sugerindo a importância dos elementos constituintes da matriz extracelular na disseminação da doença (Vicentini *et al.*, 1994). Hanna *et al.* (2000) demonstraram que a glicoproteína gp43 media a interação *in vitro* entre leveduras de *P. brasiliensis* e a linhagem de células epiteliais Vero. Posteriormente, André *et al.* (2004) demonstraram que em um modelo murino a

ligação de laminina a células leveduriformes de *P. brasiliensis* diminui a patogenicidade do mesmo. Mais recentemente, Andreotti *et al.* (2005) isolaram uma proteína de 30 kDa presente em *P. brasiliensis* capaz de se ligar a laminina, mas incapaz de se ligar a outros elementos da matriz extracelular, como fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV. Uma adesina de parede celular de 120 kDa, WI-1, foi isolada da superfície do fungo *Blastomyces dermatitidis*; esta adesina media a ligação a macrófagos derivados de monócitos humanos principalmente através da ligação a receptores tipo 3 do complemento. A disrupção do gene de WI-1 previne a ligação a macrófagos e a infecção dos mesmos, diminui a adesão e atenua a virulência do fungo (Klein, 2000; Brandhorst *et al.*, 1999). Dessa forma na blastomicose uma única molécula afeta a adesão tanto no início quanto nos estágios finais da infecção (Van Burik, *et al.*, 2001). Sabe-se que muitos fungos de importância clínica como *Candida albicans* (Gaur *et al.*, 1999; López-Ribot *et al.*, 1996), *Aspergillus fumigatus* (Bouchara *et al.*, 1997; Coulot *et al.*, 1994), *Cryptococcus neoformans* (Rodrigues *et al.*, 2003), *Pneumocystis carinii* (Kottom *et al.*, 2003), *Sporothrix schenckii* (Lima *et al.*, 2001) e *Penicillium marneffei* (Hamilton *et al.*, 1998) se ligam a proteínas da matriz extracelular. Estudos sugerem que fibrinogênio e fibronectina facilitam a adesão de conídios de *P. brasiliensis* a células da linhagem de pneumócitos humanos A549 (derivada de carcinoma pulmonar de um homem caucasiano de 58 anos) provavelmente através da interação com adesinas (González *et al.*, 2008). Foram isoladas duas proteínas (19 kDa e 32 kDa) da parede celular de *P. brasiliensis* com a habilidade de se ligar a laminina, fibrinogênio e fibronectina (González *et al.*, 2005). Todos estes estudos demonstram que os componentes da matriz extracelular são importantes nas etapas iniciais da infecção, possibilitando a adesão de diversos patógenos fúngicos e em alguns casos facilitando a invasão de células não-especializadas em fagocitose. Essas interações adesinas do patógeno - componentes da matriz extracelular podem facilitar a colonização do hospedeiro e conseqüentemente auxiliar na progressão da infecção. Além de se ligar a elementos da matriz, já foi demonstrado que *P. brasiliensis* é capaz de invadir células epiteliais não-fagocíticas e reorganizar o citoesqueleto das mesmas, alterando a morfologia da actina, tubulina e citoqueratina e além disso o patógeno também demonstrou ser capaz de induzir a apoptose de células epiteliais infectadas (Mendes-Giannini *et al.*, 2004). Estudos mostram que *P. brasiliensis*

é capaz de invadir células Vero e que a adesão varia de acordo com o isolado analisado (Mendes-Giannini *et al.*, 1994). A adesão a tecidos hospedeiros é considerada uma etapa fundamental na patogênese das infecções fúngicas. Fungos possuem uma variedade de estruturas que aderem na superfície celular e matriz extracelular. Estes organismos também secretam uma variedade de enzimas, tais como fosfolipases e proteases, consideradas fatores de virulência, dessa forma eles provocam danos à célula hospedeira e prejudicam as defesas do hospedeiro (Romani, 2004). As células epiteliais são a primeira barreira física encontrada por diversos patógenos fúngicos. A ligação do fungo a células epiteliais parece ocorrer através de receptores que se ligam a lectina, laminina e fibronectina/vitronectina nas superfícies epiteliais e essa ligação não necessariamente prejudica as funções metabólicas e estruturais do epitélio. As células epiteliais nem sempre agem como uma barreira passiva, já que vários importantes mediadores, incluindo defensinas, quimiocinas e citocinas são secretados por esses tipos celulares após contato com fungos (Benfield *et al.*, 1999). Paris *et al.* (1997) mostraram por meio de microscopia eletrônica que conídios do fungo oportunista *Aspergillus fumigatus* eram internalizados por 3 tipos de células em cultura *in vitro*: células epiteliais traqueais, células alveolares tipo II e células endoteliais, sendo que os conídios eram circundados por membranas vacuolares. Esses autores questionam se a internalização de conídios de *A. fumigatus* por células endoteliais e epiteliais seria um mecanismo de defesa do hospedeiro ou se seria um mecanismo pelo qual os conídios escapem dos fagócitos profissionais, o que ajudaria na disseminação do patógeno. Filler *et al.* (1995) relataram a fagocitose de *Candida albicans* por células endoteliais. Hanna *et al.* (2000) mostraram o parasitismo intracelular de *P. brasiliensis* em células Vero, uma linhagem de célula epitelial derivada de rins de macacos africanos (ATCC CCL81), e também mostram a replicação intracelular do fungo na célula hospedeira. Esses mesmos autores mostraram que o fungo é circundado por uma membrana vacuolar no interior da célula epitelial, o que sugere fagocitose. Esses estudos sugerem que a internalização do fungo por células epiteliais poderia ser um mecanismo por meio do qual o patógeno escape das células fagocíticas profissionais, dessa forma evitando a resposta imune inata mediada por células e utilizando os fagócitos não-profissionais como reservatório. Esses estudos

também sugerem que o parasitismo intracelular em células epiteliais poderia ser importante para o desenvolvimento da doença.

Vários trabalhos sugerem que células epiteliais podem ser importantes para iniciar uma resposta inflamatória contra vários tipos de patógenos por meio da produção de citocinas (Benfield *et al.*, 1999). Células epiteliais secretam IL-8, MCP-1 e TNF- $\alpha$  em resposta a patógenos bacterianos (Jung *et al.*, 1995). *Pseudomonas aeruginosa* induz a liberação de IL-8 por células epiteliais do trato respiratório (DiMango *et al.*, 1995), enquanto que LPS e *M. tuberculosis* induzem a liberação de IL-8 por células A549 (Lin *et al.*, 1998). Além disso, *Pneumocystis carinii* induz a produção de IL-6 e ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1) por células A549 (Pottratz *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1997). IL-8 é uma quimiocina quimiotática que induz a ativação de neutrófilos. MCP-1 é também uma quimiocina quimiotática e ativa macrófagos/monócitos e linfócitos (Benfield *et al.*, 1999). Dessa forma, células epiteliais como, por exemplo, a linhagem de pneumócito A549, analisada no presente trabalho, poderiam contribuir na reação inflamatória decorrente da presença do patógeno fúngico, auxiliando no recrutamento de macrófagos para o sítio de infecção.

## 2. Justificativa

Pouco se conhece em nível molecular sobre o processo de interação *Paracoccidioides*-células pulmonares. Até há pouco tempo pensava-se que as células epiteliais funcionassem como uma barreira física passiva para diversos tipos de patógenos. Vários estudos, entretanto, têm demonstrado que células epiteliais são capazes de liberar moléculas pró-inflamatórias, recrutando células fagocíticas para o sítio de infecção de diversos patógenos e dessa forma, participando ativamente da resposta imune do hospedeiro. Além disso, estudos mostram que *P. brasiliensis* é capaz de invadir células epiteliais e se replicar nas mesmas sugerindo que esse possa ser um mecanismo por meio do qual o patógeno evade do sistema imune tornando-se indisponível para a fagocitose via macrófagos, o que culminaria em uma resposta imune protetora. As células pulmonares são tipos celulares que provavelmente interagem inicialmente com o patógeno durante a infecção, tendo em vista que este último é inalado pelo hospedeiro. Dessa forma, entender os mecanismos moleculares desta interação complexa é importante para elucidar aspectos da progressão da doença e auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias para combater este patógeno. A fim de avaliar essas questões, no presente trabalho analisamos a resposta transcricional de *P. lutzii* (Pb01) durante a cinética de infecção de células pulmonares - pneumócitos humanos em cultura (48 e 72 h), utilizando experimentos de microarranjos de cDNA e validação por PCR em tempo real. Além de avaliar por esta última técnica o perfil transcricional de *P. brasiliensis* (Pb18) durante a cinética de infecção de pneumócitos.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

Analisar o padrão de expressão gênica diferencial de *Paracoccidioides*- *P. brasiliensis* e *P. lutzii* na cinética de interação com pneumócitos humanos visando uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na interação patógeno-hospedeiro.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Determinar a porcentagem de adesão e internalização em diferentes tempos, por contagem de UFC (unidade formadora de colônia) e microscopia óptica, a fim de estabelecer os tempos de infecção a serem analisados;
2. Estabelecer o protocolo de recuperação das células leveduriformes de *Paracoccidioides* após interação com os pneumócitos;
3. Analisar a cinética de interação de *Paracoccidioides* com os pneumócitos humanos em cultura por meio de microscopia óptica e contagem de UFC;
4. Analisar o perfil de expressão gênica de 4.500 genes de *P. lutzii* durante a cinética de interação com pneumócitos humanos em cultura por microarranjos de cDNA;
5. Analisar o perfil de expressão gênica de *Paracoccidioides* – *P. brasiliensis* e *P. lutzii* por PCR em tempo real durante a cinética de interação;
6. Analisar o padrão metabólico do *Paracoccidioides* – *P. brasiliensis* e *P. lutzii* na interação do patógeno – pneumócitos humanos em cultura.

## **4. Materiais e métodos**

### **4.1. O isolado fúngico e as condições de cultura**

*P. lutzii* (ATCC-MYA-826) e *P. brasiliensis* (Pb18) foram cultivados na forma de levedura em meio de cultura semi-sólido Fava Netto (0,3% protease peptona, 1% peptona, 0,5% extrato de carne, 4% glicose, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl, 1,7 % agar, p/v pH 7,2) por 7 dias a 37°C com o objetivo de serem utilizados nos experimentos de infecção *ex vivo* de pneumócitos humanos em cultura ou para serem utilizado como controle.

### **4.2. Cultivo da linhagem A549 de pneumócitos humanos em cultura**

A linhagem de pneumócitos A549 (ATCC CCL-185) foi utilizada nos experimentos de infecção com *Paracoccidioides*. As células foram cultivadas em frascos de cultura de 150 cm<sup>2</sup> contendo meio de cultura RPMI 1640 (Sigma Chemical, USA) suplementado com 20 mM de HEPES, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 25 µg/mL de gentamicina e 10% de soro fetal bovino (Gibco-BRL, USA) e foram mantidas a 37°C numa atmosfera de ar umidificada e com 5% de CO<sub>2</sub>. Uma vez atingida a confluência de 80-90%, foi feita a passagem das células para um novo frasco. Essas células foram lavadas com meio RPMI livre de soro para remover o soro fetal bovino residual e em seguida incubadas com 1 mL de tripsina 0,125% - EDTA 0,02% (Gibco-BRL, USA) a 37°C até se destacarem (aproximadamente 2 min). Após essas células se soltarem adicionou-se meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino para neutralizar a ação da tripsina. As células foram centrifugadas a 1.200 rpm por 8 minutos, em seguida o sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspensão em meio de cultura completo (RPMI 1640 suplementado com HEPES, bicarbonato de sódio, gentamicina e soro fetal bovino). O meio contendo as células em suspensão foi distribuído para uma densidade de 2x10<sup>7</sup> células por cada frasco de cultura de 150 cm<sup>2</sup>.

### **4.3. Infecção dos pneumócitos humanos em cultura com leveduras de *P. lutzii* (Pb01) para análise por microscopia óptica da cinética de infecção**

As células A549 foram incubadas *overnight* para adesão em lamínulas de vidro, as quais foram incubadas dentro dos poços de placas de cultura de células de 24 poços. Foram utilizadas  $5 \times 10^5$  células A549/poço e a proporção levedura:célula A549 foi 5:1. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de ar umidificada e com 5% de CO<sub>2</sub> por 1, 6, 9, 24, 48, 72 e 96 h para definir por microscopia óptica o tempo inicial para analisar o perfil de modulação da expressão gênica de *P. lutzii* durante a cinética de infecção dos pneumócitos.

#### **4.4. Contagem de UFCs (unidades formadoras de colônia) de *P. lutzii***

As células A549 foram incubadas *overnight* para adesão em poços de placas de cultura de 24 poços. Foram utilizadas as mesmas quantidades de células epiteliais e a mesma proporção levedura-pneumócito da análise por microscopia óptica descrita no item 4.3. Os tempos de interação utilizados também foram os mesmos. As células foram inicialmente lavadas com meio RPMI pré-aquecido a 37°C para retirar os fungos não aderidos e os fracamente aderidos aos pneumócitos. Em seguida, os pneumócitos foram lisados com 500 µL de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril gelada em cada poço para liberar os fungos aderidos e/ou internalizados aos pneumócitos. O conteúdo foi transferido de forma homogênea para placas de Petri contendo 20 mL BHI (brain heart infusion) ágar acrescido de soro de cavalo (Gibco, BRL-USA) a 4% (v/v), fator de crescimento de *P. brasiliensis* a 5% (v/v) e incubadas a 37°C por 7 dias. Após esse tempo de crescimento, foram contadas as unidades formadoras de colônia nas placas, sendo que cada tempo de interação foi analisado em triplicata.

#### **4.5. Infecção dos pneumócitos humanos em cultura com leveduras de *P. lutzii* e *P. brasiliensis* para extração do RNA total do fungo**

Um total de  $2 \times 10^7$  células A549 foram adicionadas por frasco de cultura de 150 cm<sup>2</sup> contendo meio RPMI suplementado com 20 mM de HEPES, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 25 µg/mL de gentamicina e 10% de soro fetal bovino. As células foram mantidas *overnight* numa atmosfera de ar umidificada e com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as monocamadas de pneumócitos foram infectadas com  $10 \times 10^7$  células leveduriformes de Pb01 ou de Pb18, na proporção levedura-pneumócito de 5:1. O co-cultivo foi incubado

numa atmosfera de ar umidificada e com 5% de CO<sub>2</sub> por 48 e 72 horas para posterior extração do RNA total das leveduras de *P. brasiliensis* e de *P. lutzii* recuperadas da infecção.

#### **4.6. Extração do RNA total de leveduras de *Paracoccidioides* internalizadas**

Após cada tempo de interação analisado, as leveduras não aderidas foram removidas por meio de lavagem com meio RPMI pré-aquecido a 37°C e em seguida os pneumócitos foram lisados pela adição de 5 mL de solução de GTC (isotiocianato de guanidina 4 M, N-lauril-sarcosina 0,5%, citrato trissódico 50 mM e 2-mercaptoetanol 0,1 M) em cada frasco. O tratamento com a solução de GTC promove a lise dos pneumócitos enquanto o fungo não é lisado uma vez que sua parede celular rica em glicana e quitina permanece intacta. As células leveduriformes foram recuperadas por centrifugação (4.000 rpm por 10 min) e utilizadas para o isolamento do RNA total de *Paracoccidioides* empregando o reagente Trizol (Invitrogen, USA) (adaptado de Tavares *et al.*, 2007). A lise do fungo foi realizada por meio de vigorosa agitação em 1 mL de reagente Trizol na presença de 80 µL de pérolas de vidros (Sigma) por 15 minutos à temperatura ambiente. Após esse procedimento as amostras foram centrifugadas (12.000 rpm por 30 s) para retirar os restos celulares do fungo e o lisado celular foi utilizado para a extração do RNA total do fungo.

Em seguida foram adicionados 200 µL de clorofórmio e após agitação vigorosa dos tubos estes foram submetidos à centrifugação (12.000 rpm por 15 minutos a 4°C). Após a centrifugação a solução foi separada em uma fase inferior fenol-clorofórmio vermelha, uma interfase e uma fase superior aquosa. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa, a qual foi transferida para um novo tubo e o RNA recuperado por precipitação com 500 µL de isopropanol. A amostra foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e posteriormente centrifugada (12.000 rpm por 15 minutos a 4°C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75% e submetido a uma nova centrifugação (7.500 rpm por 5 minutos a 4°C). Em seguida o precipitado foi deixado secando à temperatura ambiente para posteriormente ser ressuspendido em 20 µL de H<sub>2</sub>O livre de RNase. A quantidade e a qualidade do RNA

extraído foram avaliadas por meio da observação da razão das leituras espectrofotométricas nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm e visualização das bandas correspondentes aos RNAr 18S e 26S em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). O RNA extraído foi armazenado a -20°C.

A extração do RNA total de *P. brasiliensis* (Pb18) foi realizada por Marinez Mariano, estudante de Iniciação Científica do nosso grupo de pesquisa.

#### **4.7. Microarranjos de cDNA em lâminas de vidro**

##### **a) Obtenção do RNA total de referência (*pool*)**

Estudos mostram que a intensidade de fluorescência absoluta de um fluoróforo não poderia ser utilizada como uma medida confiável da quantidade de RNA devido à variabilidade na geometria do *spot* de uma lâmina de microarranjo, a quantidade de cDNA depositada em cada *spot* e a eficiência de hibridização. Entretanto, se duas amostras são marcadas com diferentes fluoróforos e co-hibridizadas nos *spots* do mesmo microarranjo, a taxa das intensidades dos sinais é uma medida mais confiável das quantidades relativas do RNA experimental (Novoradovskaya *et al.*, 2004). Muitos trabalhos utilizam um pool de referência que consiste de uma mistura de RNAs provenientes de várias linhagens celulares, desde que os genes expressos por essas linhagens celulares não representem todos os genes presentes no microarranjo (Sterrenburg *et al.*, 2002). Estes mesmos autores mostram que utilizando essa técnica e com uma boa qualidade de hibridização, mais de 99,5% dos *spots* são detectados e que há uma reproducibilidade experimental de 99,5%. Foi relatado que a intensidade de fluorescência absoluta do fluoróforo Cy5 é de 7 a 8 vezes maior que a do fluoróforo Cy3, o que muitas vezes compromete a confiabilidade e reproducibilidade do experimento. Dessa forma, padronizamos a utilização de Cy5 na marcação do RNA *pool* de referência e de Cy3 na marcação do RNA experimental e controle.

Nos experimentos de microarranjos de cDNA em vidro foi utilizado um padrão de RNA denominado “RNA de referência” o qual foi preparado misturando-se amostras de RNA das fases micelianas dos isolados Pb01 e Pb18 de *P. brasiliensis* (*pool* de referência). O RNA de referência não corresponde ao controle experimental, sendo este último extraído do isolado Pb01 cultivado *in vitro*.

### **b) Preparação dos microarranjos de cDNA em lâminas de vidro**

As amostras dos produtos de PCR foram preparadas para deposição em lâminas de vidro adicionando-se mesmo volume (1:1) de reagente D (Amersham Biosciences) e transferidas para microplacas de 384 poços (Genetix). Através do robô Array Spotter Generation III (Amersham Biosciences) as amostras foram depositadas sobre as lâminas por um conjunto de 12 agulhas, sendo que cada uma deposita um volume de 0,9 nL baseada na ação de capilaridade na superfície das lâminas de vidro. Após a deposição de cada conjunto de amostras, as agulhas foram lavadas automaticamente em uma estação de lavagem que utiliza sucessivamente água purificada (18 megaohm), etanol absoluto (Merck), solução de KOH 0,2 M e água novamente. As agulhas foram secas com nitrogênio 5,0 analítico antes das amostras seguintes serem carregadas. A câmara de deposição das amostras em lâminas do Array Spotter III possui temperatura e umidade controladas, sendo a umidade relativa de deposição próxima de 55% e a temperatura em torno de 25°C. Após a deposição e secagem de todas as amostras nas lâminas, os pontos contendo as seqüências de cDNA foram fixados por *cross-linking* irradiando-se com 500 mJ de energia UV (Hoefer UV Crosslinker).

### **c) Marcação das sondas de cDNA com os fluorocromos Cy3 e Cy5**

As amostras de RNA (experimento e *pool*) foram marcadas utilizando o kit Cyscribe Post-Labeling (Amersham Biosciences) que permite a preparação do cDNA em dois passos. No primeiro passo ocorre a síntese da primeira fita de cDNA com a incorporação de nucleotídeos amino-alil dUTP (AAdUTP) modificados, e posterior degradação da cadeia de mRNA e em seguida a purificação do cDNA para remoção de nucleotídeos livres e oligômeros. No segundo passo, o cDNA é marcado com formas reativas de ésteres NHS Cy3 (utilizado para marcar as amostras) e Cy5 (utilizado para marcar o *pool* de RNA) que se ligam aos nucleotídeos modificados. Após um processo de purificação para eliminação dos CyDye não incorporados a sonda está pronta para hibridação.

#### **- Preparação da primeira fita de cDNA por incorporação de AAdUTP**

Em um tubo tipo Eppendorf, em banho de gelo, foram adicionados 10 µg de RNA total, 1 µL de oligonucleotídeo randômico, 3 µL de oligo dT e 0,5 µL de controle denominado *spike mix* para o Universal Score Card em um volume total de 11 µL (proporção de 2 µL de spike mix para cada 1 µg de mRNA marcado). Todo esse procedimento é realizado em duplicata. A reação foi misturada cuidadosamente e incubada a 70°C por 5 min, sendo posteriormente resfriada a 4°C durante 5 min. A extensão da cadeia de cDNA foi realizada utilizando 4 µL de tampão 5X CyScript, 2 µL de DDT 0,1M, 1 µL de nucleotídeo *mix*, 1 µL de AA-dUTP, 1 µL de transcriptase reversa CyScript, em um volume final de reação de 20 µL. A reação foi incubada a 42°C por 1,5 horas. A degradação do mRNA foi realizada adicionando 2 µL de NaOH 2,5 M com incubação a 37°C durante 15 min, e em seguida adicionando 20 µL de HEPES 2 M para equilibrar a solução. A purificação do cDNA foi realizada usando colunas CyScribe GFX.

#### **- Incorporação de Cy3 e Cy5**

A amostra de cDNA marcada com amino-alil e purificada foi adicionada a um tubo contendo a alíquota de CyDye NHS éster e ressuspensa várias vezes. O material foi centrifugado a 13.800 x g por 1 min e incubado no escuro durante 1 hora. Adicionou-se 15 µL de hidroxilamina 4 M seguida de incubação no escuro durante 15 min a temperatura ambiente. Os cDNAs marcados também foram purificados com as colunas GFX.

#### **- Quantificação do CyDye incorporado no cDNA**

Após a purificação dos cDNAs marcados foi realizada a monitoração de incorporação dos fluorocromos por meio de leitura em espectrofotômetro VIS (Ultrospec 2100, Amersham Biosciences) em comprimento de onda de 550 nm para Cy3 e 650 nm para o Cy5 com amostras diluídas 100 vezes. A quantidade de Cy3 ou Cy5 incorporada no cDNA pode ser calculada através do seu coeficiente de extinção molar 150.000 L. $\cdot$ mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> para Cy3 e 250.000 L. $\cdot$ mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> para Cy5. As proporções de Cy3 e Cy5 incorporados no cDNA foram calculadas através da fórmula: (A)/E x Z x fator de

diluição  $\times 10^{12}$ , em que A= absorvância de Cy3 a 550 nm ou Cy5 a 650 nm, E= coeficiente de extinção molar para Cy3 ou Cy5  $\times 10^{-6}$  e Z= volume ( $\mu\text{L}$ ) da sonda após purificação.

Para hibridações com os dois fluoróforos foram adicionados os cDNA marcados com Cy3 e Cy5 em um tubo de microcentrífuga protegido da luz. A solução de cDNA foi evaporada em um aparelho “Speed Vacuum”. A seguir, o cDNA foi dissolvido em 6  $\mu\text{L}$  de água livre de nuclease e desnaturado a 95°C por 2 min. A solução foi imediatamente resfriada no gelo por 30 segundos. À essa reação foram adicionados 1,5  $\mu\text{L}$  de A<sub>80</sub> (1mg/mL) e o sistema foi incubado a 75°C por 45 min.

#### **d) Hibridação das lâminas com os microarranjos**

As lâminas de microarranjos foram hibridadas utilizando um processador automático de lâminas, “Lucidea Automated Slide Processor”- ASP (Amersham Biosciences) que permite a hibridação e lavagens de lâminas em câmaras independentemente controladas. Este aparelho inclui um programa que automatiza a injeção de amostras líquidas e soluções de lavagens ou ar dentro das câmaras e possui parâmetros de controle de temperatura, velocidade de injeção e circulação destas soluções no interior das mesmas. As sondas de cDNA marcadas com Cy3 (amostras) e Cy5 (*pool* de RNA) foram feitas da mesma maneira que no item anterior, e as lâminas foram hibridadas por 15 horas a 42°C. As condições de lavagens foram: 1X SSC/0,2% SDS (2 vezes por 20 segundos à temperatura ambiente); 0,1X SSC/0,2% SDS (2 vezes por 20 segundos à temperatura ambiente); 0,1X SSC (2 vezes por 20 segundos à temperatura ambiente). A última lavagem das lâminas foi feita com isopropanol, sendo em seguida aquecidas a 42°C, e novamente lavadas com isopropanol. Após as lavagens as lâminas foram aquecidas a 60°C para secagem e posteriormente foram colocadas no “Array Scanner” (Amersham Biosciences) para obtenção das imagens.

#### **e) Aquisição das imagens dos microarranjos**

As lâminas foram colocadas no aparelho “Array Scanner Gen III” (Amersham Biosciences) e as imagens foram obtidas com feixes de raios laser para as duas cores, o comprimento de onda de excitação do laser de 532 nm para o verde e 633 nm para o

vermelho para cada um dos *spots* sobre o microarray. A leitura da lâmina gera dois arquivos com imagens separadas para os dois canais de cores (Cy3 e Cy5) e uma imagem colorida de sobreposição produzida com auxílio do programa ImageQuant (Amersham Biosciences).

#### **f) Análise dos Dados**

A quantificação das imagens dos microarranjos foi obtida com o programa Spotfinder (TIGR). A filtragem, normalização e análise dos dados foram realizadas no ambiente estatístico R versão 2.7.1 (Ihaka e Gentleman, 1996), com o auxílio dos pacotes Limma (Smyth, 2004), Bioconductor (Ihaka e Gentleman, 1996), Aroma (Bengtsson, 2004) e KTH (Wirta, 2003). Foram aplicados métodos de normalização “Printtip” Lowes (Lowess por agulhas) e re-escalonamento dos valores M pelo valor de MAD (“Median Absolute Deviation”) (Yang *et al.*, 2002).

#### **g) Detecção de genes diferencialmente expressos**

Para a detecção de genes diferencialmente expressos foi utilizado o programa SAM (*Significance Analysis of Microarray*) (Tusher *et al.*, 2001). Este programa utiliza um método de análise baseado no teste-*t* de *Student* modificado para a detecção da expressão gênica diferencial em larga escala. O SAM identifica genes com variações estatisticamente significativas na expressão pela assimilação de uma série de testes-*t* gene-específicos. Para cada gene é designado um valor baseado na sua variação na expressão gênica relativa a um desvio padrão de repetidas medidas para tal gene (Tusher *et al.*, 2001). O SAM possui ainda um fator para estimar a significância, denominado “q-value” que mede o quão significativa é a diferença de expressão de um determinado gene entre as condições de estudo. O “q-value” testa a probabilidade de que uma dada hipótese nula seja estatisticamente significativa, podendo analisar múltiplas hipóteses nulas, enquanto que o “p-value” testa apenas uma hipótese nula. Valores de  $q \leq 0.05$  foram considerados significativos. A porcentagem de genes identificados por mudanças aleatórias é denominado de taxa de falsas descobertas-FDR (false discovery rate) sendo definido como a proporção esperada falsos positivos. Neste trabalho, adotou-se um  $FDR \leq 5\%$ .

#### **4.8. Desenho de oligonucleotídeos para PCR em tempo real**

Inicialmente, as sequências gênicas de interesse de *P. lutzii* (Pb01) e *P. brasiliensis* (Pb18) foram alinhadas utilizando-se o *software* BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) com a finalidade de se analisar as regiões de polimorfismo gênico entre as duas espécies e excluí-las da sequência final escolhida para o desenho de oligonucleotídeos. Tal estratégia foi escolhida tendo em vista que o objetivo era desenhar iniciadores compatíveis com as duas espécies. Todos os pares de oligonucleotídeos foram desenhados e sintetizados usando o programa Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), baseado nas sequências obtidas do banco de dados do projeto Transcriptoma de *P. brasiliensis* (Felipe *et al.*, 2005 e <http://www.biomol.unb.br/Pb-eng>) e Projeto Genoma de *P. brasiliensis* ([http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis/MultiHome.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html)). Em seguida, os oligonucleotídeos selecionados foram analisados utilizando-se o programa Oligo Analyzer da Integrated DNA Technologies (IDT), também disponível *online* (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) e por último analisados utilizando o *software* Primer Express (Applied Biosystems). O controle interno empregado nos experimentos de PCR em tempo real foi o gene alfa-tubulina, cuja expressão é constitutiva e não diferencial entre as fases leveduriforme e miceliana de *Paracoccidioides*, conforme verificado no banco de dados do Projeto Transcriptoma.

#### **4.9. Tratamento do RNA total com DNase I**

Após quantificação por espectrofotometria (Genequant – Amersham Pharmacia Biotech) e a verificação da integridade do RNA total por eletroforese em gel de agarose 1% em condições livres de RNase, a amostra foi submetida à precipitação com etanol e acetato de sódio e em seguida foi tratada com DNase I livre de RNase (Promega), com o objetivo de se eliminar qualquer traço residual de contaminação por DNA genômico. As condições de tratamento com DNase I, para um volume final de 70 µL de reação, foram: tampão da DNase I 1X; 7U da enzima DNase I livre de RNase. O tratamento foi realizado à 37°C por 30 minutos, parando-se a reação pela adição de 7 µL do tampão de inativação da enzima e aquecendo-se a amostra por 10 minutos a 65°C.

#### 4.10. Síntese de cDNA

Após tratamento com DNase I, a primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 2 µg de RNA total de cada amostra. A essa quantidade de RNA total foram adicionados 0,5 µg do iniciador OligodT<sub>18</sub> e a mistura foi incubada a 70°C por 10 min, seguido de resfriamento imediato por incubação no gelo por cerca de 1 min. À amostra foi adicionado o MIX, para um volume final de 25 µL, contendo os seguintes reagentes em suas concentrações finais: tampão da transcriptase reversa 1X; DTT 8 mM; 0,4 mM dNTPs; 20U RNase Out (Invitrogen). Em seguida, a reação de polimerização foi realizada por incubação a 42°C por 2 min, sendo adicionado ao sistema 200U da enzima transcriptase reversa (SuperScript III, Invitrogen) e incubando-se a 42°C por mais uma hora. A seguir, a enzima foi inativada por aquecimento a 70°C por 20 min.

#### 4.11. PCR em tempo real de genes diferencialmente expressos

As reações de amplificação foram realizadas com o aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) em uma reação de 12 µL contendo: 0,4 µM de cada primer, 6 µL of SYBR Green PCR 2x Master mix (Applied Biosystems) e 0,2 µL de molde de cDNA. Após a desnaturação inicial a 95°C por 10 min, as amplificações foram realizadas com 40 ciclos 95°C por 15 segundos, seguidos por 60°C por 1 minuto. Para confirmar a especificidade da amplificação, os produtos da PCR foram submetidos à análise da curva de anelamento. O gene constitutivo de *P. brasiliensis* alfa-tubulina (5'-CGAGGTTTGCAATCTCCATATT-3' e 3'-AACCTTTCTCACGAACCCTTG-5') foi escolhido como controle endógeno para as reações de PCR em tempo real de todos os genes de interesse de *Paracoccidioides* recuperado de pneumócitos humanos em comparação com o controle (*Paracoccidioides in vitro*). Os outros oligonucleotídeos utilizados foram catalase P (5'-CGCCACATGAACGGCTATT-3' e 3'-GCACGTCCAGGATGGGTATT-5'), Hsp 104 (5'-TGGCTGGTAACTTGGCTTCTG-3' e 3'-GGTACGGGCGTAGTCGAGAG-5'), gliceraldeído-3-P desidrogenase (5'-ATGGGCGTCAACGAGAAGAG-3' e 3'-GAGTGGAGCGAGGCAGTTG-5'), alfa ceto-glutarato desidrogenase (5'-TGCTGACTGGCGTGCTACTT-3' e 3'-GGGTTGGTCGGTTTCATTGT-5'), glicose-6-P isomerase (5'-CCGCCTACCTCCAACAACCTC-3' e 3'-CCCGTGCTGTATCGGACATA-5'), álcool

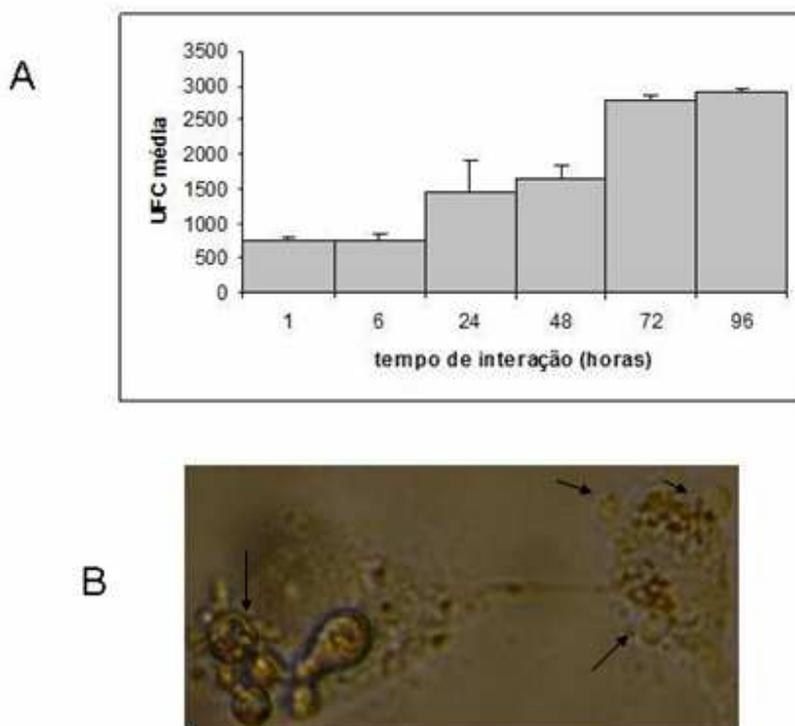
desidrogenase (5'- GAAGGCGGCACATGTCACT-3' e 3'- CAGTCACTCCGGCACAGAGA-5'), Hsp70 (5'-GCCACTCAGACCACCATTGA-3' e 3'-GGCGTTCAGATCCTCGAAAC-5'), Hsp60 (5'- TATCACCACCACTGAAGAGATTGC-3' e 3'-ACTATGGGTACAACCGTTTCG, alfa-glucana sintase (5'-ACGTAGCTGGAGCCCTAGTATCC-3' e 3'-TCAAGACCTACGTTACGTTCC-5') , SOD (5'-CTGTTCGCTGGGTTTGC-3' e 3'-TACTACCTTCGGCAGTGATGATC-5'), enolase (5'-GTAACCGAGACTGGGCTTCATC-3' e 3'-AGATGGCCAGTCGTACTCCG-5'). Os experimentos de PCR em tempo real foram realizados em triplicata para todos os genes analisados.

Ensaio de PCR em tempo real permitem monitorar o progresso da reação. As reações são caracterizadas pelo momento durante o ciclo quando a amplificação do alvo é primeiramente detectada contrapondo-se à quantidade acumulada do alvo ao final da reação de PCR comum. A quantificação relativa determina a variação na expressão de uma seqüência de um ácido nucléico (alvo) em uma amostra teste quando comparada com a mesma seqüência em uma amostra de referência. Esta última pode ser um controle não-tratado ou uma amostra no tempo zero de um estudo cinético (Livak *et al.*, 2001). Tal tipo de quantificação fornece uma ótima comparação entre o nível inicial da molécula-alvo em cada amostra mesmo sem se saber o número exato de cópias desta molécula. O método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  pode ser utilizado para calcular variações relativas na expressão gênica em experimentos de PCR em tempo real e foi escolhido para as análises do presente trabalho (Livak, 2001 e Boletim do Usuário da Applied Biosystems).

## 5. Resultados

### **5.1. Cinética de adesão/internalização de leveduras de *P. lutzii* (Pb01) por pneumócitos humanos em cultura (A549)**

Com o objetivo de verificar a porcentagem de adesão/internalização de *P. lutzii* por pneumócitos humanos foram realizadas a contagem de UFCs das leveduras de *P. lutzii* aderidas/internalizadas e a microscopia óptica da interação durante o co-cultivo nos tempos de 1, 6, 24, 48, 72 e 96 horas. Os resultados mostram claramente que o fungo interage e adere aos pneumócitos nos tempos iniciais de infecção, a partir de 1 hora de co-cultura (**figura 1 A**). A partir de 48 horas de co-cultivo há uma maior quantidade de fungos aderidos/internalizados aos pneumócitos comparado com os tempos iniciais de infecção. Baseado nesta cinética de interação, os tempos de 48 h, 72 h e 96 h foram escolhidos para análise da expressão diferencial por microarranjos dos genes de *P. lutzii* internalizados por pneumócitos humanos.



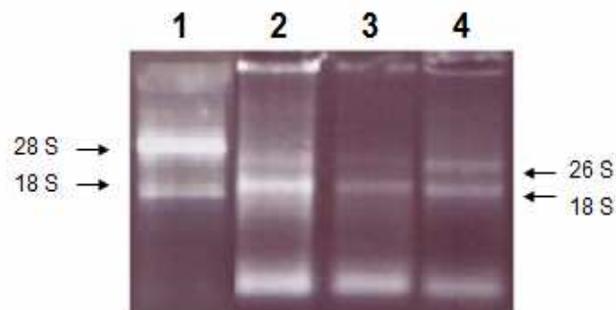
**Figura 1. Cinética da adesão/internalização de pneumócitos humanos por *P. lutzii*.**

(A) Média de UFCs (unidades formadoras de colônias) de leveduras de *P. lutzii* aderidas/internalizadas ao longo de 96 horas de infecção *ex vivo*. (B) Microfotografia (1000x) representativa do ponto de 96 horas de co-cultivo. Setas: leveduras internalizadas ou aderidas. Pneumócitos e leveduras foram incubados obedecendo a uma razão de levedura/pneumócito de 5:1 a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Os dados mostrados são derivados um experimento realizado em triplicata (média ± SEM).

## 5.2. Análise em gel de agarose do RNA total extraído de *P. lutzii* internalizado

A integridade dos RNAs de *P. lutzii* controle (crescido em meio Fava-Netto) ou internalizado foi avaliada através da eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Na **figura 2** é possível observar a presença das bandas ribossomais bem definidas e ausência de degradação. A quantificação e confirmação da pureza das

amostras foram realizadas pelo uso do aparelho GeneQuant (Amersham Pharmacia Biotech).



**Figura 2. Perfil eletroforético do RNA total extraído de *P. lutzii*.** 1. RNA total extraído de pneumócitos não-infectados. 2 e 3. RNA total extraído de *P. lutzii* internalizado após 96 h de co-cultivo com pneumócitos humanos em cultura. 4. RNA total extraído de *P. lutzii* controle crescido em meio de cultura.

### 5.3. Microarranjos de cDNA em lâminas de vidro

A expressão gênica diferencial foi analisada no isolado Pb01 de *P. brasiliensis* após internalização em pneumócitos nos tempos de 48, 72 e 96 h de infecção. A análise dos dados de expressão gênica de *P. lutzii*, pelo programa SAM, revelou que nos tempos de 48, 72, e 96 horas, um total de 417, 928 e 611 genes foram diferencialmente expressos, respectivamente. No entanto, somente aqueles genes com uma indução/repressão  $\geq 1,10$  foram considerados para as análises. Dentre estes genes havia vários cujas sequências ainda não haviam sido identificadas. Os genes modulados com sequências conhecidas foram agrupados em 25 principais categorias funcionais (metabolismo de açúcares, metabolismo de aminoácidos e proteínas, metabolismo de lipídios, metabolismo de nucleotídeos, metabolismo de esteróis, metabolismo de vitaminas e cofatores, resposta ao estresse, citoesqueleto, histonas, proteínas ribossomais, proteínas mitocondriais, regulação transcricional/traducional, transdução de sinal, mating, ciclo celular, desidrogenases, fosfatases, sintases/sintetases, transferases, ligases/liases, hidrolases, parede celular, vacuolares/vesiculares, resistência a drogas, ciclo celular). No anexo deste trabalho estão apresentadas as **tabelas 1, 2 e 3** referentes ao genes diferencialmente

expressos de *P. lutzii* internalizado por pneumócitos humanos nos tempos de 48, 72 e 96 horas de infecção, respectivamente. Variações de expressão gênica maiores que 1 são consideradas induções, enquanto que valores menores que 1 são considerados repressões. Nosso grupo possui experiência com experimentos de microarranjos de cDNA (Tavares *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2008), sendo que os trabalhos realizados utilizando microarranjos em membranas de *nylon* apresentaram altos valores de variações na expressão gênica. Após escolher-se a utilização de microarranjos de cDNA em lâminas de vidro, como no caso deste trabalho, observou-se, de uma forma geral, valores muito baixos de variações de expressão gênica comparados com os obtidos através da metodologia anteriormente citada. Sabe-se que pneumócitos não são células especializadas em fagocitose, dificultando a recuperação de leveduras do seu interior e consequentemente limitando a quantidade de RNA total extraído de *P. lutzii*, o que exigiu tempo dispendioso para obter tais amostras. Com isso, a partir da análise das principais categorias de genes diferencialmente modulados obtidas com os experimentos de microarranjos, além da análise das categorias identificadas por Tavares *et al.*(2007) nos ensaios de *P. lutzii* fagocitado por macrófagos peritoniais, definiram-se as categorias utilizadas nos experimentos de PCR em tempo real. As categorias escolhidas para *P. lutzii* (Pb01) também foram utilizadas na análise por PCR em tempo real de *P. brasiliensis* (Pb18) internalizado por pneumócitos.

#### **5.4. Análise da expressão gênica de *Paracoccidioides* após internalização por pneumócitos humanos**

A expressão gênica diferencial de *P. lutzii* (Pb01) e de *P. brasiliensis* (Pb18) após internalização por pneumócitos humanos foi analisada nos tempos de 48 e 72 h de infecção. Como previamente discutido, houve muita dificuldade na recuperação do fungo do interior dos pneumócitos, uma vez que estes não são células especializadas em fagocitose, e consequentemente houve limitações na quantidade de RNA total extraído de *Paracoccidioides*. Desta forma, no caso do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* a análise do perfil transcricional foi conduzida somente por meio de ensaios de PCR em tempo real,

técnica extremamente sensível e que requer pequenas quantidades de amostra, além de ser amplamente utilizada para este fim.

As **tabelas 4 e 5** mostram respectivamente os genes de *P. lutzii* internalizado por pneumócitos humanos cuja expressão foi diferencialmente modulada nos tempos de 48 e 72 h de infecção quando comparado com este mesmo fungo crescido em meio de cultura (controle). Pode-se observar que de uma forma geral houve uma redução nos níveis dos transcritos de *P. lutzii* ao longo da cinética de infecção, exceto para aqueles relacionados à parede celular. Tais resultados evidenciam a ocorrência de reprogramação gênica do fungo em resposta ao ambiente intracelular do hospedeiro.

Tabela 4. Resultados PCR em tempo real – *P. lutzii* (Pb01) internalizado por pneumócitos humanos após 48 h de infecção.

Categoria funcional	Gene	Amostra	Média C <sub>T</sub> do gene	2 <sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup>	Fold – repressão/ indução***	Fold micro-arranjos****
Metabolismo de carboidratos	Álcool desidrogenase	Controle*	30,34 ± 0,42	1,04 ± 0,31	- 21,0	1,15
		Infecção	35,51 ± 0,44	0,05 ± 0,01		
	Glicose-6-P-isomerase	Controle	26,91 ± 0,20	1,01 ± 0,16	- 5,0	–
		Infecção	30,25 ± 0,69	0,20 ± 0,09		
	α-cetoglutarato-desidrogenase	Controle	26,18 ± 0,16	1,01 ± 0,13	- 7,7	1,75
		Infecção	30,06 ± 0,05	0,13 ± 0,01		
Parede celular	Enolase	Controle	33,15 ± 0,12	1,00 ± 0,11	+ 1,5	–
		Infecção	33,46 ± 0,03	1,48 ± 0,08		
	α-glucana sintase	Controle	27,13 ± 0,08	1,00 ± 0,09	- 6,2	–
		Infecção	30,67 ± 0,15	0,16 ± 0,01		
	Gliceraldeído-3-P-desidrogenase	Controle	26,58 ± 0,18	1,01 ± 0,15	NS**	–
		Infecção	27,55 ± 0,66	1,18 ± 0,14		
Estresse oxidativo	Hsp 60	Controle	29,41 ± 0,79	1,16 ± 0,08	-58,0	–
		Infecção	35,57 ± 0,03	0,02 ± 0,01		
	Hsp 70	Controle	25,75 ± 0,10	1,00 ± 0,10	-3,3	1,70
		Infecção	28,37 ± 0,16	0,30 ± 0,03		
	Hsp 104	Controle	25,55 ± 0,01	1,00 ± 0,07	- 2,7	1,24
		Infecção	27,89 ± 0,13	0,37 ± 0,03		
	Catalase P	Controle	27,41 ± 0,33	1,03 ± 0,24	- 34,3	0,81
		Infecção	33,34 ± 0,11	0,03 ± 0,00		
	Superóxido dismutase 3	Controle	26,88 ± 0,25	1,01 ± 0,09	- 7,7	–
		Infecção	30,71 ± 0,18	0,13 ± 0,01		

\*Controle – *P. lutzii* crescido em meio Fava-Netto na temperatura de 37°C (levedura)

\*\* Indução e/ou repressão Não Significativa

\*\*\*Valores positivos representam indução e valores negativos representam repressão gênica

\*\*\*\*Valores maiores que um representam indução e valores menores que um representam repressão gênica

Tabela 5. Resultados PCR em tempo real – *P. lutzii* (Pb01) internalizado por pneumócitos humanos após 72 h de infecção.

Categoria funcional	Gene	Amostra	Média C <sub>T</sub> do gene	2 <sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup>	Fold – repressão/ indução***	Fold micro-arranjos ****
Metabolismo de carboidratos	Álcool desidrogenase	Controle*	30,34 ± 0,42	1,04 ± 0,31	- 3,3	1,10
		Infecção	32,92 ± 0,12	0,31 ± 0,03		
	Glicose-6-P-isomerase	Controle	26,91 ± 0,20	1,01 ± 0,16	- 1,7	1,26
		Infecção	28,58 ± 0,33	0,60 ± 0,13		
	α-cetoglutarato-desidrogenase	Controle	26,18 ± 0,16	1,01 ± 0,13	- 1,3	1,28
		Infecção	27,52 ± 0,36	0,76 ± 0,19		
Parede celular	Enolase	Controle	33,15 ± 0,12	1,00 ± 0,11	+ 1,8	–
		Infecção	33,18 ± 0,22	1,82 ± 0,29		
	α-glucana sintase	Controle	27,13 ± 0,08	1,00 ± 0,09	- 2,8	–
		Infecção	29,50 ± 0,18	0,36 ± 0,05		
	Gliceraldeído-3-P-desidrogenase	Controle	26,58 ± 0,18	1,01 ± 0,15	+1,8	1,10
		Infecção	26,62 ± 0,02	1,81 ± 0,14		
Estresse oxidativo	Hsp 60	Controle	29,41 ± 0,79	1,16 ± 0,08	- 5,5	–
		Infecção	32,55 ± 0,03	0,21 ± 0,01		
	Hsp 70	Controle	25,75 ± 0,10	1,00 ± 0,10	- 1,8	
		Infecção	27,49 ± 0,06	0,55 ± 0,03		
	Hsp 104	Controle	25,55 ± 0,01	1,00 ± 0,07	NS**	0,75
		Infecção	26,62 ± 0,17	0,89 ± 0,11		
	Catalase P	Controle	27,41 ± 0,33	1,03 ± 0,24	- 8,6	–
		Infecção	31,31 ± 0,03	0,12 ± 0,00		
	Superóxido dismutase 3	Controle	26,88 ± 0,25	1,01 ± 0,09	- 1,7	–
		Infecção	28,68 ± 0,62	0,58 ± 0,23		

\*Controle – *P. lutzii* crescido em meio Fava-Netto na temperatura de 37°C (levedura).

\*\* Indução e/ou repressão Não Significativa

\*\*\*Valores positivos representam indução e valores negativos representam repressão gênica

\*\*\*\*Valores maiores que um representam indução e valores menores que um representam repressão gênica

## **5.5. Análise comparativa da expressão gênica de *P. lutzii* (Pb01) e de *P. brasiliensis* (Pb18) após internalização por pneumócitos humanos**

Em paralelo ao presente trabalho, foi conduzida por nosso grupo a análise da expressão gênica do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* internalizado por pneumócitos humanos. Estes experimentos foram conduzidos de forma independente por Marinez Mariano, estudante de Iniciação Científica do nosso grupo de pesquisa.

O isolado Pb18 pertence à espécie filogenética S1 de *P. brasiliensis* (Matute *et al.*, 2006), enquanto que o isolado Pb01 vem sendo considerado uma nova espécie do gênero *Paracoccidioides* (Teixeira *et al.*, 2009). Devido às diferenças filogenéticas, morfológicas e fisiológicas destes dois isolados, optou-se por analisar comparativamente os perfis transcricionais dos mesmos após infectar pneumócitos humanos.

As **tabelas 6 e 7** apresentam os genes do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* internalizado por pneumócitos humanos cuja expressão foi diferencialmente modulada nos tempos de 48 e 72 h de infecção, respectivamente, quando comparado com este mesmo fungo crescido em meio de cultura (controle).

Fraga (2008) observou que leveduras de Pb01 possuem um diâmetro menor que leveduras de Pb18 e demonstrou que macrófagos peritoniais murinos (MH-S) fagocitam mais rapidamente e em maior quantidade leveduras de Pb01 em comparação com Pb18. O presente trabalho mostra que todos os genes analisados de *P. lutzii* foram induzidos quando se compara o tempo de 48 h com 72 h de infecção. Por outro lado, os níveis de transcritos de Pb18 apresentaram uma maior variabilidade no decorrer da cinética quando se compara o tempo de 48 h com 72 h, mas ainda assim mantiveram induções/repressões concordantes com as observadas em *P. lutzii*.

De forma geral, conforme o que foi observado para *P. lutzii* (Pb01), houve também uma redução nos níveis dos transcritos do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* em resposta ao ambiente do interior do pneumócito, exceto no caso de dois transcritos relacionados à parede celular e curiosamente no caso do transcrito da enzima superóxido dismutase 3.

Ao se comparar a reprogramação gênica das duas espécies na interação com pneumócitos humanos observa-se uma plasticidade transcricional semelhante. Isto evidencia que mesmo Pb01 e Pb18 sendo representantes de duas espécies filogeneticamente distintas existem muitas similaridades no que se refere à resposta

adaptativa ao microambiente do pneumócito humano, tanto é que até há pouco tempo eram considerados como uma espécie única.

Tabela 6. Resultados PCR em tempo real – **Pb18** internalizado por pneumócitos humanos após 48 h de infecção.

<b>Categoria funcional</b>	<b>Gene</b>	<b>Amostra</b>	<b>Média C<sub>T</sub> do gene</b>	<b>2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> Fold</b>	<b>Fold – repressão/ indução***</b>
Metabolismo de carboidratos	Álcool desidrogenase	Controle	27,83 ± 0,67	1,11 ± 0,48	- 1,6
		Infecção	31,11 ± 0,03	0,66 ± 0,05	
	Glicose-6-P-isomerase	Controle	25,73 ± 0,07	1,00 ± 0,09	NS**
		Infecção	28,70 ± 0,65	0,89 ± 0,08	
	α-cetoglutarato-desidrogenase	Controle	23,82 ± 0,32	1,02 ± 0,24	- 50
		Infecção	31,70 ± 0,13	0,02 ± 0,01	
Parede celular	Enolase	Controle	25,00 ± 0,44	1,05 ± 0,31	+ 4,5
		Infecção	25,46 ± 0,18	4,70 ± 0,45	
	α-glucana sintase	Controle	25,40 ± 0,31	1,02 ± 0,22	NS**
		Infecção	28,53 ± 0,07	0,73 ± 0,28	
	Gliceraldeído-3-P desidrogenase	Controle	24,26 ± 0,21	1,01 ± 0,16	+ 1,1
		Infecção	26,75 ± 0,28	1,16 ± 0,08	
Estresse oxidativo	Hsp 60	Controle	26,60 ± 0,80	1,16 ± 0,28	- 2,7
		Infecção	30,62 ± 0,69	0,43 ± 0,04	
	Hsp 70	Controle	23,17 ± 0,15	1,00 ± 0,11	- 2,0
		Infecção	27,26 ± 1,00	0,50 ± 0,16	
	Hsp 104	Controle	22,01 ± 0,10	1,00 ± 0,10	- 3,4
		Infecção	26,50 ± 0,34	0,29 ± 0,12	
	Catalase P	Controle	25,24 ± 0,12	1,00 ± 0,11	- 1,2
		Infecção	28,55 ± 1,00	0,79 ± 0,08	
	Superóxido dismutase 3	Controle	32,50 ± 0,22	1,01 ± 0,16	+ 187
		Infecção	26,75 ± 0,51	366,59 ± 179,62	

\*Controle – *P. brasiliensis* crescido em meio Fava-Netto na temperatura de 36°C (levedura).

\*\* Indução e/ou repressão Não Significativa

\*\*\*Valores positivos representam indução e valores negativos representam repressão gênica

Tabela 7. Resultados PCR em tempo real – **Pb18** internalizado por pneumócitos humanos após 72 h de infecção.

<b>Categoria funcional</b>	<b>Gene</b>	<b>Amostra</b>	<b>Média C<sub>T</sub> do gene</b>	<b>2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> Fold</b>	<b>Fold – repressão/ indução***</b>
Metabolismo de carboidratos	Álcool desidrogenase	Controle*	27,83 ± 0,67	1,11 ± 0,48	NS**
		Infecção	31,11 ± 0,03	0,77 ± 0,14	
	Glicose-6-P-isomerase	Controle	25,73 ± 0,07	1,00 ± 0,09	- 9,1
		Infecção	28,70 ± 0,65	0,11 ± 0,06	
	α-cetoglutarato-desidrogenase	Controle	23,82 ± 0,32	1,02 ± 0,24	- 10,2
		Infecção	31,70 ± 0,13	0,10 ± 0,05	
Parede celular	Enolase	Controle	25,00 ± 0,44	1,05 ± 0,31	+ 2,5
		Infecção	25,46 ± 0,18	2,68 ± 0,19	
	α-glucana sintase	Controle	25,40 ± 0,31	1,02 ± 0,22	- 2,5
		Infecção	28,53 ± 0,07	0,40 ± 0,14	
	Gliceraldeído-3-P desidrogenase	Controle	24,26 ± 0,21	1,01 ± 0,15	+ 1,4
		Infecção	26,75 ± 0,28	1,43 ± 0,15	
Estresse oxidativo	Hsp 60	Controle	26,60 ± 0,80	1,16 ± 0,28	- 100,0
		Infecção	30,62 ± 0,69	0,01 ± 0,00	
	Hsp 70	Controle	23,17 ± 0,15	1,00 ± 0,11	- 1,6
		Infecção	27,26 ± 1,00	0,68 ± 0,15	
	Hsp 104	Controle	22,01 ± 0,10	1,00 ± 0,10	- 1,6
		Infecção	26,50 ± 0,34	0,63 ± 0,23	
	Catalase P	Controle	25,24 ± 0,12	1,00 ± 0,11	- 4,3
		Infecção	28,55 ± 1,00	0,23 ± 0,15	
	Superóxido dismutase 3	Controle	32,50 ± 0,22	1,01 ± 0,16	+ 6,2
		Infecção	26,75 ± 0,51	6,20 ± 3,63	

\*Controle – *P. brasiliensis* crescido em meio Fava-Netto na temperatura de 36°C (levedura).

\*\* Indução e/ou repressão Não Significativa

\*\*\*Valores positivos representam indução e valores negativos representam repressão gênica

As **figuras 3, 4 e 5** apresentam, respectivamente, a análise comparativa dos níveis de expressão de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos, parede celular e estresse oxidativo em *P. lutzii* (Pb01) e *P. brasiliensis* (Pb18). Na **figura 3** observa-se que em ambas as espécies houve uma redução no nível de transcritos relacionados à glicólise, ciclo do ácido cítrico e fermentação alcoólica, o que pode ser explicado em parte pela presença de baixos níveis de glicose no interior do pneumócito humano. Observa-se ainda uma diferença na expressão de glicose-6-P isomerase, que no tempo de 72 h apresentou uma maior repressão, enquanto que em Pb18 houve uma menor repressão.

Nota-se na **figura 4** uma redução nos níveis do transcrito de  $\alpha$ -glucana sintase ao longo da cinética e também um aumento no nível dos transcritos das adesinas gliceraldeído-3-P desidrogenase e enolase, sendo o aumento nos níveis desta última mais notáveis em Pb18. Nessa figura observa-se que ao se comparar os níveis de transcritos de Pb01 nos tempos de 48 e 72 h houve indução de um tempo para o outro, enquanto que em Pb18 há variabilidade.

A **figura 5** mostra uma redução nos níveis de transcritos relacionados ao estresse oxidativo em ambas as espécies, sendo notável a repressão do transcrito Hsp60 nos dois casos analisados.

Figura 3. Análise comparativa dos níveis de expressão de genes relacionados ao **metabolismo de carboidratos** em *P. lutzii* (Pb01) e *P. brasiliensis* (Pb18).

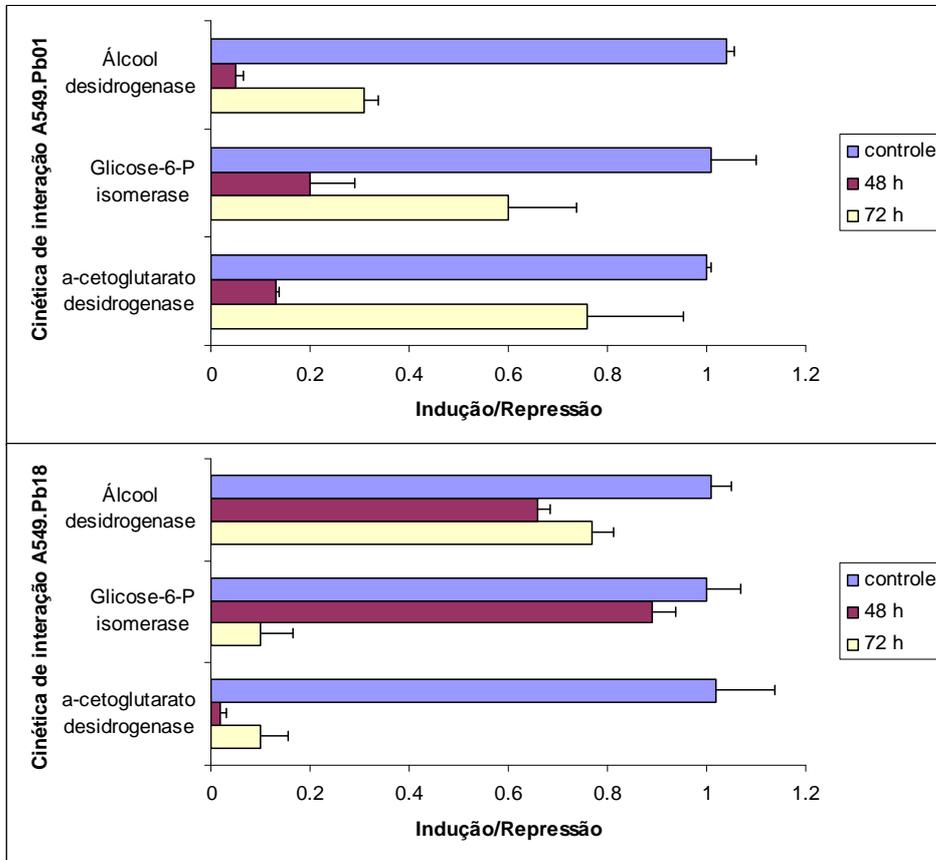


Figura 4. Análise comparativa dos níveis de expressão de genes relacionados à **parede celular** em *P. lutzii* (Pb01) e *P. brasiliensis* (Pb18).

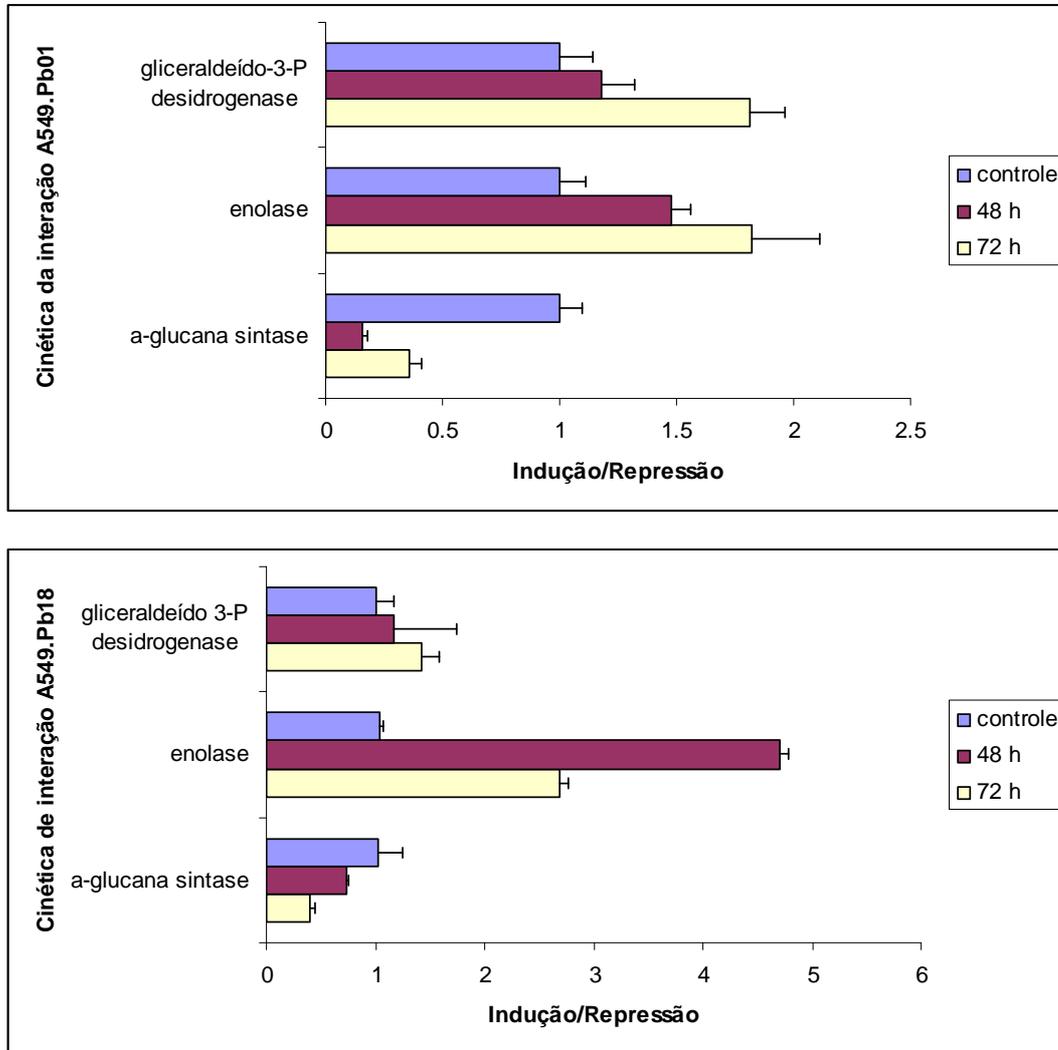
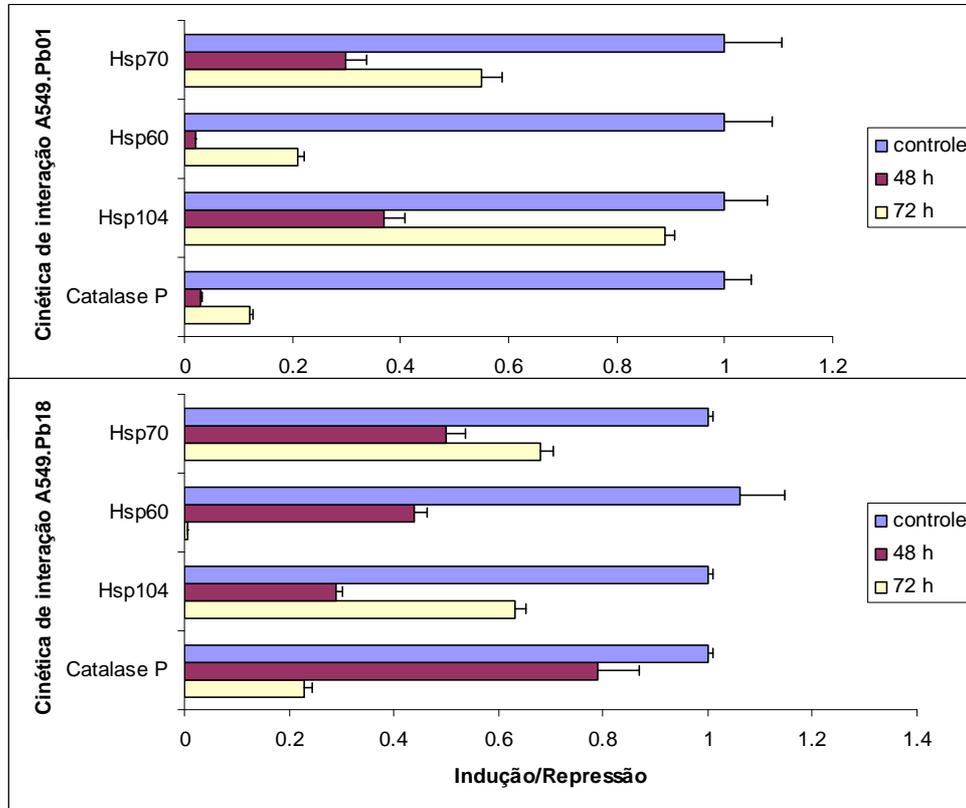


Figura 5. Análise comparativa dos níveis de expressão de genes relacionados à **resposta ao estresse oxidativo** em *P. lutzii* (Pb01) e *P. brasiliensis* (Pb18).



## 6. Discussão

A seguir serão discutidos em detalhe os genes das principais categorias funcionais de *P. brasiliensis* que foram diferencialmente expressos durante a cinética de infecção de pneumócitos humanos em cultura, considerando os dados existentes na literatura bem como a análise comparativa entre as espécies *P. brasiliensis* (Pb18) e *P. lutzii* (Pb01).

### **Análise comparativa da expressão gênica entre os isolados Pb01 e Pb18 relacionada à:**

#### **6.1. Metabolismo de carboidratos**

Tavares *et al.* (2007) mostraram que *P. lutzii* fagocitado por macrófagos murinos peritoniais após 6 horas de infecção apresentaram uma redução nos níveis de alguns transcritos relacionados à glicólise, provavelmente porque o ambiente do fagossoma é descrito como sendo pobre em glicose, induzindo essa resposta adaptativa no patógeno. Por outro lado, em condições que mimetizam a via hematológica de disseminação deste patógeno, Bailão *et al.* (2007) não verificaram a repressão de genes da via glicolítica, já que o fungo se encontrava em um ambiente rico em nutrientes. No presente trabalho foi observado um perfil transcricional similar ao de *P. brasiliensis* fagocitado por macrófagos murinos, uma vez que houve uma redução nos níveis de um transcrito relacionado à glicólise (glicose-6-P isomerase) e de um transcrito relacionado ao ciclo do ácido cítrico ( $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase) em ambos os isolados. Tal resultado foi observado provavelmente porque o interior dos pneumócitos não é um ambiente rico em glicose.

No projeto Transcriptoma de *P. brasiliensis* foi relatado que em leveduras de Pb01 cultivado *in vitro* a álcool desidrogenase aparece induzida, sugerindo que provavelmente é importante a produção de ATP via fermentação alcoólica na forma leveduriforme deste fungo (Felipe *et al.*, 2005). No presente trabalho o gene que codifica a enzima álcool desidrogenase foi negativamente modulado durante toda a cinética de infecção dos pneumócitos nos dois isolados de *P. brasiliensis*, sendo que a redução no nível de transcritos foi maior em Pb01, provavelmente por esse gene já possuir um maior nível de expressão em leveduras deste isolado.

## 6.2. Parede celular

Nos últimos anos, vários trabalhos descreveram inúmeras adesinas de *P. brasiliensis* (Andreotti *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2005; Mendes-Giannini *et al.*, 2006; Vicentini *et al.*, 1994). Em fungos patogênicos, várias dessas moléculas com características de adesinas foram capazes de se ligar a elementos da matriz extracelular.

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que foi positivamente modulada no tempo de 72 h de infecção em ambos os isolados, constitui uma família de proteínas que apresenta diversas atividades em diferentes localizações subcelulares, além da sua bem caracterizada função na glicólise. Recentemente foi caracterizada uma GAPDH de *P. brasiliensis* sendo esta associada à parede celular do fungo e reconhecida por laminina, fibronectina e colágeno tipo I. Além disso, em experimentos de infecção *in vitro* esta proteína mostrou ser importante no processo de adesão e internalização do fungo por pneumócitos humanos, sugerindo um importante papel de GAPDH no estabelecimento da doença (Barbosa *et al.*, 2006). Dessa forma, a modulação positiva do gene que codifica para GAPDH no presente trabalho indica que esta proteína e sua atividade de ligação a elementos da MEC tenham uma importante função no processo infeccioso da PCM.

Enolase é uma abundante enzima da via glicolítica, podendo ter funções alternativas na superfície celular em adição à sua atividade enzimática. Em *Candida albicans*, a enolase se associa às glucanas como um antígeno imunodominante na parede celular (Angiolella *et al.*, 1996). Trabalhos sugerem que a enolase de *Candida* seja importante em infecções sistêmicas de candidíase (van Deventer *et al.*, 1994), mas ainda não é clara a função dessa enzima na patogênese dessa doença. Um trabalho recente identificou uma molécula de enolase associada à superfície de leveduras do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* (Donofrio *et al.*, 2009). A enolase indentificada por estes autores foi caracterizada como uma molécula de 54 kDa, que funciona como uma adesina de ligação a fibronectina e quando inibida por um anticorpo específico diminui em 80% a adesão do fungo a pneumócitos da linhagem A549. No presente trabalho, a enolase foi positivamente modulada em ambos os isolados, sendo que houve um maior acúmulo de transcritos no isolado Pb18. Um estudo realizado por nosso grupo analisou as proteínas totais das formas miceliana e leveduriforme de *P. lutzii* (Pb01) e proteínas diferencialmente expressas foram observadas. Uma dessas proteínas, a PbM46 (derivada

da forma miceliana) foi seqüenciada na sua região N-terminal e observou-se a presença de resíduos de aminoácidos similares aos encontrados na enzima enolase de outros fungos (Cunha *et al.*, 1998). Esses resultados sugerem que a enzima enolase provavelmente seja importante na colonização de células e tecidos do hospedeiro, uma vez que ela é importante na adesão do isolado Pb18 a pneumócitos humanos e como mostrado no presente trabalho o transcrito da enolase está positivamente modulado tanto em Pb18 quanto em *P. lutzii* (Pb01). Além disso, esta enzima é uma das principais proteínas encontradas no micélio (forma infectante) de *P. lutzii* (Cunha *et al.*, 1998), reforçando a importância da mesma na disseminação deste fungo nos tecidos do hospedeiro.

### **6.3. Resposta ao estresse oxidativo**

A família Hsp70 compreende muitas chaperonas moleculares com duas regiões conservadas características, uma ATPase N-terminal e um domínio C-terminal de ligação à proteína. Em muitos organismos, Hsp70 constitui uma grande família de proteínas, sendo composta de múltiplos membros. Estas proteínas estão presentes em muitos compartimentos numa célula eucariótica se ligando a pequenas regiões hidrofóbicas de polipeptídeos desdobrados, prevenindo dessa forma a sua agregação e ela também auxilia o dobramento de proteínas-alvo de uma forma ATP-dependente (Nicola *et al.*, 2005). O gene *hsp70* de *P. brasiliensis* é induzido tanto durante o choque térmico de leveduras a 42°C, quanto durante a transição de micélio para levedura, sendo importante na sobrevivência do patógeno em células hospedeiras. A expressão diferencial deste gene pode ser observada entre as formas micelianas e leveduriformes, sendo que o nível de expressão é muito maior na levedura. Essa expressão diferencial de *hsp70* de *P. brasiliensis* parece ser controlada pelo *splicing* diferencial dos íntrons de *hsp70*, que são eficientemente removidos apenas na fase leveduriforme do fungo (Silva *et al.*, 1999). *P. brasiliensis* parece sofrer uma adaptação às altas temperaturas do hospedeiro e isto é frequentemente concomitante com a diferenciação celular do parasita. Dessa forma, a expressão aumentada de proteínas de choque térmico (Hsps) na fase de levedura, detectada no transcriptoma de *P. brasiliensis* (Felipe *et al.*, 2005) seria importante para que o fungo suportasse o estresse térmico para se diferenciar, infectar e colonizar o

hospedeiro humano. Hsp104 é uma chaperona associada com a desagregação de proteínas *in vivo* e *in vitro*, sendo encontrada em fungos, plantas e bactérias, mas não é encontrada em animais. Atua em conjunto com Hsp70, na chamada rede bichaperona, desagregando proteínas. Lindquist *et al.* (1996) relataram que Hsp104 é suficiente para a termotolerância no fungo *S. cerevisiae*. Já foi demonstrado que a Hsp60 de *S. cerevisiae* é importante na defesa contra o estresse oxidativo, uma vez que esta chaperona protege vários tipos de proteínas Fe/S, evitando a liberação de íons ferro e dessa forma evitando danos celulares (Cabiscol *et al.*, 2002).

No presente trabalho foi observada uma redução no nível dos transcritos das três proteínas de choque térmico, Hsp60, Hsp70 e Hsp104 em ambas as espécies, provavelmente porque o microambiente do interior dos pneumócitos não apresenta condições críticas de estresse para a levedura, tais como temperatura ou a presença de altos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs). Para se confirmar os níveis de EROs ainda é necessária a condução de ensaios de dosagem dos níveis dessas substâncias no interior dos pneumócitos

As catalases são metaloenzimas que convertem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e oxigênio molecular. Esta enzima é importante na infecção por *Candida albicans*, sendo que os mutantes nulos para o gene que codifica esta molécula apresentam uma menor capacidade de sobreviver em um modelo murino de infecção (Wysong *et al.*, 1998). A isozima catalase P de *Paracoccidioides* é altamente expressa na fase leveduriforme deste fungo e regulada positivamente na transição de micélio para levedura e no contato das células com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Moreira *et al.*, 2004). Além disso, a catalase P deste fungo também está envolvida no controle de EROs exógenas (Chagas *et al.*, 2008). No presente trabalho observou-se uma diminuição nos níveis de transcritos da catalase isozima P em ambas as espécies de *Paracoccidioides* durante a cinética de infecção. Tal resultado pode ser explicado pelo fato dos pneumócitos aparentemente não produzirem quantidades significativas de espécies reativas de oxigênio. A redução dos níveis de transcritos se mostrou maior no isolado Pb01 (*P. lutzii*), provavelmente por este já possuir a isozima P da catalase altamente expressa na sua fase leveduriforme. Curiosamente, o transcrito SOD3, que codifica a superóxido dismutase Cu-Zn esteve presente em altos níveis durante a cinética de infecção de *P. brasiliensis* (Pb18) em contraste com os baixos níveis observados em

Pb01 (*P. lutzii*), evidenciando uma diferença entre estas duas espécies em resposta ao microambiente do pneumócito humano.

## 7. Conclusões e perspectivas

Este trabalho descreve pela primeira vez o perfil transcricional de *Paracoccidioides* em resposta a adesão/internalização por pneumócitos humanos, tipo celular abundante nos pulmões. Foi proposto para a PCM e para outras micoses sistêmicas como a histoplasmose e a coccidioidomicose, que o parasitismo intracelular é um evento marcante para o estabelecimento e progressão da doença em hospedeiros suscetíveis, possibilitando a latência do fungo ou disseminação a partir dos pulmões para outros órgãos e tecidos (Brummer *et al.*, 1989).

Os dados gerados neste trabalho fornecem informações relevantes para o entendimento da interação entre *Paracoccidioides* e pneumócitos humanos, possibilitando um melhor entendimento do desenvolvimento da PCM e a identificação de genes que codificam para proteínas de adesão as quais contribuem para o processo de virulência.

### Como principais resultados deste trabalho têm-se:

- 1 - Diminuição nos níveis de transcritos dos genes envolvidos na glicólise e ciclo do ácido cítrico, evidenciando uma provável adaptação do patógeno em ambientes inóspitos (glicose não disponível), em concordância com o que já foi descrito para os macrófagos peritoniais (Tavares *et al.*, 2007).
- 2 - Aumento nos níveis de transcritos dos antígenos de superfície enolase e gliceraldeído-3-P desidrogenase nos isolados Pb01 e Pb18 internalizados por pneumócitos humanos; fato este que não foi observado na infecção de macrófagos por *P. lutzii* (Pb01) (Tavares *et al.*, 2007).
- 3 - Diminuição dos níveis de transcritos nos isolados Pb01 e Pb18 relacionados ao estresse oxidativo, evidenciando que no ambiente dos pneumócitos provavelmente não ocorre uma produção relevante de espécies reativas de oxigênio, em contraste com o que já foi descrito para os macrófagos peritoneais (Tavares *et al.*, 2007).

4 - Observa-se ainda uma plasticidade transcricional similar entre *P. brasiliensis* e *P. lutzii* para sobreviverem ao microambiente de pneumócitos humanos em cultura.

#### **Como principais perspectivas têm-se:**

- 1 - Análise por microscopia confocal dos antígenos de superfície enolase e gliceraldeído-3-P desidrogenase durante a cinética de interação *P. brasiliensis* - pneumócito;
- 2 - Quantificação das citocinas secretadas pelos pneumócitos durante a cinética por meio de ensaios de ELISA;
- 3 - Dosagem dos níveis de espécies reativas de oxigênio no interior de pneumócitos infectados e não-infectados;
- 4 - Quantificação das atividades das proteínas codificadas pelos principais genes diferencialmente modulados neste trabalho para confirmação da correlação nível de RNAm - nível da proteína codificada.

## **8. Referências Bibliográficas**

- Almeida, A.J., Matute, D.R., Carmona, J.A., Martins, M., Torres, I., McEwen, J.G., Restrepo, A., Leão, C., Ludovico, P. and Rodrigues, F. 2007. Genome size and ploidy of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals a haploid DNA content: flow cytometry and GP43 sequence analysis. *Fungal Genet Biol.* **44**: 25-31.
- Alves, L.M.C., Figueiredo, F., Brandão Filho, S.L., Tincani, I. & Silva, C.L. 1987. The role of fractions from *Paracoccidioides brasiliensis* in the genesis of inflammatory response. *Mycopathologia* (Den Haag), **97**: 3-7.
- Andreotti, P.F., da Silva, J.L.M., Bailão, A.M., Soares, C.M.A., Benard, G., Soares, C.P., Mendes-Giannini, M.J.S. 2005. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes and Infection* **7**: 875–881
- André, D., Lopes, J.D., Franco, M.F., Vaz, C.A.C., Calich, V. 2004. Binding of laminin to *Paracoccidioides brasiliensis* induces a less severe pulmonary

paracoccidioidomycosis caused by virulent and low-virulence isolates. *Microbes and Infection*. **6**(6): 549-558.

Angiolella, L., Facchin, M., Stringaro, A., Maras, B., Simonetti, N., Cassone, A. Identification of a glucan-associated enolase as a main cell wall protein of *Candida albicans* and an indirect target of lipopeptide antimycotics. 1996. *J. Infect. Dis.* **173** (3): 684-90.

Aristizbal, B. H., Clemons, K. V., Stevens, D. A., Restrepo, A. 1998. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. *Infect Immun.* **66**: 5587-5591.

Bailão, A.M., Schrank, A., Borges, C.L., Parente, J.A., Dutra, V., Felipe, M.S.S. Fiúza, R.B., Pereira, M., Soares, C.M.A. 2007. The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1–15.

Barbosa, M. S., Bão, S.N., Andreotti, P.F., Faria, F.P., Felipe, M.S., Feitosa, L.S., Mendes-Giannini, M.J., Soares, C.M.A. 2006. Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infection and Immunity.* **74**: 282-389.

Bartnicki-Garcia S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annual Rev Microbiol*; **22**:87–108.

Benfield, T.L., Lundgren, B., Shelhamer, J.H., Lundgren, J.D. 1999. *Pneumocystis carinii* major surface glycoprotein induces interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 release from a human alveolar epithelial cell line. *Eur. J. Clin. Invest.* **29**:717–722.

- Bengtsson, H. 2004. *aroma - An R Object-oriented Microarray Analysis environment*. 2004. Preprints in Mathematical Sciences **18**, Mathematical Statistics, Lund University.
- Bouchara, J. P., Sánchez, M., Chevailler, A., Marot-Leblond, A., Lissitzky, J. C., Tronchin, G., Chabasse, D. 1997. Sialic acid-dependent recognition of laminin and fibrinogen by *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect. Immun.* **65**:2717–2724.
- Brandhorst, T.T., Wuthrich, M., Warner, T., Klein, B. 1999. Targeted gene disruption reveals an adhesin indispensable for pathogenicity of *Blastomyces dermatitidis*. *J. Exp. Med.* **189**:1207–16.
- Brummer, E., Hanson, L.H., Restrepo, A., Stevens, D.A. 1989. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect Immun*; **57**: 2289– 94.
- Brummer, E., Castaneda, E., Restrepo, A. 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin.Microbiol. Rev.* **6**: 89-117.
- Cabiscol, E., Bellí, G., Tamarit, J., Echavet, P., Herrero, E., Ross, J. 2002. Mitochondrial Hsp60, resistance to oxidative stress, and the labile iron pool are closely connected in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry.* **277**: 44531-38.
- Carbonell, L.M. 1969. Ultrastructure of dimorphic transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriology.* **100**: 1076-1082.
- Chagas, R.F., Bailão, A.M., Pereira, M., Winters, M.S., Smullian, A.G., Jr., G.S.D., Soares, C.M.A. 2008. The catalases of *Paracoccidioides brasiliensis* are differentially regulated: Protein activity and transcript analysis. *Fungal Genetics and Biology.* **45**: 1470-1478.

- Coulot, P., Bouchara, J. P., Renier, G., Annaix, V., Planchenault, C., Tronchin, G., Chabasse, D. 1994. Specific interaction of *Aspergillus fumigatus* with fibrinogen and its role in cell adhesion. *Infect. Immun.* **62**: 2169– 2177.
- Coutinho, Z.F., Silva, D., Lazera, M., Petri V., Oliveira, R.M., Sabroza, P.C., Wanke, B. 2002. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad. Saúde Pública* **18**:1441-1454.
- Cunha, A.F., Souza, M.V., Silva, S.P., Jesuino, R.S., Soares, C.M., Felipe, M.S. 1999. Identification, N-terminal region sequencing and similarity analysis of differentially expressed proteins in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medical Mycology.* **37** (2): 115-121.
- Derengowski, L.S., Tavares, A.H., Silva, S. S., Procópio, L.S., Felipe, M.S.S. & Silva-Pereira, I. 2008. Upregulation of glyoxylate cycle genes upon *Paracoccidioides brasiliensis* internalization by murine macrophages and *in vitro* nutritional stress condition. *Medical Mycology.* **46**(2):125-34
- DiMango, E., Zar, H.J., Bryan, R., Prince, A. 1995. Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J Clin Invest.* **96**: 2204–10.
- Donofrio, F.C., Calil, A.C., Miranda, E.T., Almeida, A.M., Benard, G., Soares, C.P., Veloso, S.N., Soares, C.M., Mendes-Giannini, M.J. 2009. Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. *J. Med. Microbiol.* **58**(Pt6): 706-13.
- Felipe, M.S., Andrade R.V., Petrofeza S.S., Maranhão 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., Leitão L., Martins C.R., Moraes L.M., Neves E.O., Nicola A.M.,

Alves E.S., Parente J.A., Pereira M., Poças-Fonseca M.J., Resende R., Ribeiro B.M., Saldanha R.R., Santos S.C., Silva-Pereira I., Silva M.A., Silveira E., Simões I.C., Soares R.B., Souza D.P., De-Souza M.T., Andrade E.V., Xavier M.A., Veiga H.P., Venancio E.J., Carvalho M.J., Oliveira A.G., Inoue M.K., Almeida N.F., Walter M.E., Soares C.M., Brígido M.M. 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast*. **20**(3): 223-32.

Felipe, M.S., Andrade, R.V., Arraes, F.B., Nicola, A.M., Maranhão, A.Q., Torres, F.A., Silva-Pereira, I., Poças-Fonseca, M.J., Campos, E.G., Moraes, L.M., Andradde, P.A., Tavares, A.H., Silva, S.S., Kyaw, C.M, Souza, D.P., Network P., Pereira M., Jesuíno, R.S., Andrade, E.V., Parente, J.A., Oliveira, G.S., Barbosa, M.S., Marins, N.F., Fachin, A.L., Cardoso, R.S., Passos, G.A., Almeida, N.F., Wlater, M.E., Soares, C.M., Carvalho, M.J., Brigido, M.M. 2005. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J. Biol Chem*. **280**:24706-24714.

Feitosa, L.S., Cisalpino, P.S., dos Santos, M.R., Mortara, R.A., Barros, T.F., Morais, F.V., Puccia, R., Da Silveira, J.F., de Camargo, Z.P. 2003. Chromosomal polymorphism, syntenic relationships and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet. Biol.* **39**(1): 60-9.

Fernandes, L., Paes, H.C., Tavares, A.H., Silva, S.S., Dantas, A., Soares, C.M.A., Torres, F.A. and Felipe, M.S.S. 2008. Transcriptional profile of *ras1* and *ras2* and the potential role of farnesylation in the dimorphism of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Yeast Research*, v. 8, p. 300-310.

Figueiredo, F., Alves L.M., Silva, C.L. 1993. Tumor necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. *Clin. Exp. Immunol.* **93**:189-94.

- Filler, S.G., Swerdloff, J.N., Hobbs C., Luckett, P.M. 1995. Penetration and damage of endothelial cells by *Candida albicans*. *Infect Immun.* **63**(3):976-83.
- Fink, A.L. 1999. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol. Rev.* **79**: 425-449.
- Fraga, C.L.F. Análise comparativa das variações morfológicas entre dois diferentes isolados (Pb01 e Pb18) do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* e da sua interação com o sistema imune do hospedeiro. Brasília, 2008. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília.
- Franco, M. 1987. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet Mycol.* **25**:5-15.
- Franco, M., Peraçoli, M.T.S., Soares, A.M.V.C, Montenegro, M.R., Mendes, R.P., Meira, D.A. 1993. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *Curr. Trop. Med. Mycol.* **5**: 115-149.
- Gaur, N. K., Klotz, S. A., Henderson, R. L. 1999. Overexpression of the *Candida albicans* *ALAI* gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in aggregation following attachment of yeast cells to extracellular matrix proteins, adherence properties similar to those of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **67**: 6040–6047.
- Goldman, G.H., Marques, M.E., Duarte, R., de Souza Bernardes, L.A., Quiapin, A.C., Vitorelli, P.M. *et al.* 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.
- González, A., Gómez, B.L., Diez, S., Hernández, O., Restrepo, A., Hamilton, A.J., Cano, L.E. 2005. Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. *Infection and Immunity*, p. 2486–2495.

- González, A., Caro, E., Muñoz, C., Restrepo, A., Hamilton, A.J., Cano, L.H. 2008. *Paracoccidioides brasiliensis* conidia recognize fibronectin and fibrinogen which subsequently participate in adherence to human type II alveolar cells: Involvement of a specific adhesion. *Microbial Pathogenesis*, **44**: 389-401.
- Hallak, J., San-Blas, F., San-Blas, G. 1982. Isolation and wall analysis of dimorphic mutants of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia*. **20**: 51-62
- Hamilton, A. J., Jeavons, L., Youngchim, S., Vanittanakom, N., Hay, J. R. 1998. Sialic acid-dependent recognition of laminin by *Penicillium marneffeii* conidia. *Infect. Immun.* **66**:6024–6026.
- Hanna, S.A., Monteiro da Silva, J.L., Mendes-Giannini, M.J.S. 2000. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microb. Infect.* **2**:877–884.
- Hay, E.D. 1991. Cell Biology of Extracellular Matrix. New York: Plenum 2nd Ed, 468.
- Ihaka, R. and Gentleman, R. 1996. "R: A language for data analysis and graphics," *Journal of Computational and Graphical Statistics* **5**, 299-314.
- Isberg, R.R., Voorhis, D.L., Falkow, S. 1987. Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* **50**:769-78
- Jung, H.C., Eckmann L., Yang S-K, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E. 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest.* **95**: 55–65
- Kanetsuna, F., Carbonell, L.M. 1970. Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol.* **101**(3):675-80.

- Kanetsuna, F., Carbonell, L.M., Azuma, I., Yamamura, Y. 1972. Biochemical studies on thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol.* **110**:208–218.
- Kashino, S. S., Calich, V. L. G., Burger, E., Singer-Vermes, L. M. 1985. In vivo and in vitro characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Mycopathologia* **92**:173-178.
- Kashino, S. S., Calich V. L. G., Singer-Vermes, L. M., Abrahamsohn, P. A., Burger, E.. 1987. Growth curves, morphology and ultrastructure of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Mycopathologia* **99**:119-128.
- Klein, B.S. 2000. Molecular basis of pathogenicity in *Blastomyces dermatitidis*: the importance of adhesion. *Curr.Opin. Microbiol.* **3**:339–43
- Klotz, S.A., Smith, R.L. 1991. A fibronectin receptor on *Candida albicans* mediates adherence of the fungus extracellular matrix. *J. Infect. Dis.* **163**:604-10
- Kostrzynska, M., Schalen, C., Wadstrom, T. 1989. Specific binding of collagen type IV to *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **59**:229-34
- Kottom, T. J., Kohler, J. R., Thomas, C. F. Jr., Fink, G. R., Limper A. H. 2003. Lung epithelial cells and extracellular matrix components induce expression of *Pneumocystis carinii* STE20, a gene complementing the mating and pseudohyphal growth defects of *ste20* mutant yeast. *Infect. Immun.* **71**: 6463–6471.
- Leininger E., Roberts M., Kenimer I.G., Charles I.G., Fairweather N., *et al.* 1991. Pertactin, an Arg-Gly-Asp containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:345-49

- Leininger E., Ewanowich CA, Bhargava A, Peppler MS, Kenimer JG, *et al.* 1992. Comparative roles of the Arg-Gly-Asp sequence present in the *Bordetella pertussis* adhesins pertactin and filamentous hemagglutinin. *Infect. Immun.* **60**:2380-85.
- Li, J., Kogan, M., Knight, S.A., Pain, D., Dancis, A. 1999. Yeast mitochondrial protein, Nfs1p, coordinately regulates iron-sulfur cluster proteins, cellular iron uptake, and iron distribution. *J. Biol. Chem.* **274**:33025–33034.
- Lima, O. C., C. C. Figueiredo, J. O. Previato, L. Mendonca-Previato, V. Morandi, and L. M. Lopes Bezerra. 2001. Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. *Infect. Immun.* **69**:6874–6880.
- Lin, Y., Zhang, M., Barnes, P.F. 1998. Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest.* **66**: 1121–6.
- Lindquist, S., Kim, G. 1996. Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**(11):5301-6
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods.* **25**: 402-408.
- López-Ribot, J.L., Monteagudo, C., Sepúlveda, P., Casanova, M., Martínez, J. P., Chaffin, W. L. 1996. Expression of the fibrinogen binding mannoprotein and the laminin receptor of *Candida albicans* *in vitro* and in infectious tissues. *FEMS Microbiol. Letters* **142**:117–122.
- Matute, D.R., McEwen, J.G., Montes, B.A., San-Blas, G., Bagagli, E., Rauscher, J.T., Restrepo, A., Morais, F., Nino-Vega, G., Taylor, J.W. 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol. Biol. Evol.* **23**:65–73.

- Mendes-Giannini, M.J.S., Ricci, L.C., Uemura, M.A., Toscano, E., Arns, C.W. 1994. Infection and apparent invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.* **32**:189–197.
- Mendes-Giannini, M.J.S., Hanna, S.A., Monteiro, Da Silva J.L., Andreotti, P.F., Benard, G., Lenzi, H.L., Soares, C.P. 2004. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. *Microb Infect.*; **6**:882–91.
- Montoya, A.E., Moreno, M.N., Restrepo, A., McEwen, J.G. 1997. Electrophoretic karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genetics and Biology* **21**: 223–227
- Montoya, A.E., Alvarez, A.L., Moreno, M.N., Restrepo, A., McEwen, J.G. 1999. Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* **37**: 219-22.
- Moreira, S.F., Bailão, A.M., Barbosa, M.S., Jesuino, R.S.A., Felipe, M.S.S., Pereira, M., Soares, C.M.A., 2004. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis. *Yeast* **21**, 173–182.
- Nicola, A., Andrade, R.V., Silva-Pereira, I. Molecular chaperones in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. 2005. *Genet. Mol. Res.* **4** (2): 346-357.
- Novoradovskaya, N., Whitfield, M.L., Basehore, L.S., Novoradovsky, A., Pesich, R., Usary, J., Karaca, J., Wong, W.K., Aprelikova, O., Fero, M., Perou, C.M., Botstein, D., Braman, J. 2004. Universal Reference RNA as a standard for microarray experiments. *BMC Genomics* **5**:20.

- Paris, Sophie, Boisvieux-Ulrich, E., Crestani, B., Houcine, O., Taramelli, D., Lombardi, L., Latge, J-P. 1997. Internalization of *Aspergillus fumigatus* Conidia by Epithelial and Endothelial Cells. *Infection and Immunity*. **5**(4):1510–1514
- Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J., Hook, M. MSCRAMM— Mediated adherence of microorganisms to host tissues. 1994. Review, *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 585–617.
- Pottratz, S.T., Reese, S., Sheldon, J.L. 1998. *Pneumocystis carinii* induces interleukin 6 production by an alveolar epithelial cell line. *Eur J Clin Invest.* **28**: 424–9.
- Rappleye, C.A., Engle, J.T., Goldman, W. E. 2004. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for  $\alpha$ -(1,3)-glucan in virulence. *Molecular Microbiology*. **53** (1): 153.165.
- Rappleye, C.A., Eissenberg, L.G., Goldman, W.E. 2007. *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. *PNAS*. **104**(4):1366-70.
- Reiman, D., Tuomanen, E., Falkow, S., Golenbock, D.T., Saukonen, K., *et al.* 1990. Recognition of a bacterial adhesin by a eukaryotic integrin: CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) on human macrophages binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell*. **61**: 1375-82
- 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**: 346-53.
- Restrepo, A., McEwen, J.G., Castaneda, E. 2001. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med.Mycol.* **39**: 233-241.

- Rodrigues, M. L., G. dos Reis, R. Puccia, L. R. Travassos, and C. S. Alviano. 2003. Cleavage of human fibronectin and other basement membrane-associated proteins by a *Cryptococcus neoformans* serine proteinase. *Microb. Pathog.* **34**:65–71.
- Ruoslahti, E. 1991. Integrins. *J Clin Invest.* **87**(1):1-5.
- 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**: 711-713.
- San-Blas, G., F.V. San-Blas. 1977. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. *Mycopathologia.* **62**:77-86.
- San-Blas, G. 1982. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationship. A review. *Mycopathologia* 79:159–184.
- San-Blas, G., San-Blas, F. 1984. Molecular aspects of fungal dimorphism. *CRC Crit Rev Microbiol* 11: 101–127.
- San-Blas, G. 1986. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall glucans, pathogenicity, and dimorphism. In: M McGinnis, ed. *Current Topics in Medical Mycology*. Vol.1. New York: Springer-Verlag. pp 235–257
- San-Blas, G. & Nino-Vega, G. 2001. in *Fungal Pathogenesis: Principles and Clinical Applications*, pp. 205–226, Marcel Dekker, New York
- San-Blas, G., Nino-Vega, G., Iturriaga, T. 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med. Mycol.* **40**: 225–242.

- San-Blas, G., Niño-Vega, G. 2008. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. *Mycopathologia*. **165**:183–195
- Silva, C.L.; Alves, L.M.C., Figueiredo, F. 1994. Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology*, **140**: 1189-1194.
- Silva, S.P., Borges-Walmsley, M.I., Pereira, I.S., Soares, C.M.A., Walmsley, A.R., Felipe, M.S.S. 1999. Differential expression of an hsp 70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mol. Microbiol.* **31**:1039–1050.
- Silva, S.S., Tavares, A.H., Passos-Silva, D.G., Facchin, A.L., Teixeira, S.M., Soares, C.M., Bocca, A.L., Carvalho, M.J., Silva-Pereira, I., Passos, G.A., Felipe, M.S. 2008. Transcriptional response of murine macrophages upon infection with opsonized *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infection* **10**(1):12-20.
- Singer-Vermes, L.M., Burger, E., Franco, M.F., Di-Bacchi, M.M., Mendes-Giannini, M.J., Calich, V.L. 1989. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *J.Med.Vet.Mycol.* **27**(2):71-82.
- Smyth, G.K. 2004. "Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments," *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*: Vol. **3**(1) Article 3.
- Sterrenburg, E., Turk, R., Boer, J.M., van Ommen, G.B., den Dunnen, J.T. 2002. A common reference for cDNA microarray Hybridizations. *Nucleic Acids Research*, Vol. 30 No. 21 e116.

- Stover, E.P.; Shar, G.; Clemons, K.V.; Stevens, D.A. & Feldman, D. 1986. Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect. Immun.*, **51**:199-203.
- Tarkkanen, A-M, Allen, B.L., Westerlund, B., Holthofer, H., Kuusela, P., *et al.* 1990. Type V collagen as target for type-3 fimbriae, enterobacterial adherence organelles. *Mol. Microbiol.* **4**(1): 353-61
- Tavares, A.H., Silva, S.S., Dantas, A., Campos, E.G., Andrade, R.V., Maranhão, A.Q., Brígido, M.M., Passos-Silva, D.G., Facchin, A.L., Teixeira, S.M., Passos, G.A., Soares, C.M., Bocca, A.L., Carvalho, M.J., Silva-Pereira, I., Felipe, M.S. 2007. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbes Infect* **9**:583-590.
- Teixeira, M. M., Theodoro, R.C., Carvalho, M. J. A., Fernandes, L., Paes, H. C., Hahn, R. C., Mendoza, L., Bagagli, E., San-Blas, G., Felipe, M. S. S. 2009. GCPSR analysis demonstrates a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus (in revision). *Molecular Phylogenetics and Evolution*.
- Tusher, V.G., Tibshirani, R., Chu, G. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 5116-5121.
- Untereiner, W.A., Scott, J.A., Naveau, F.A., Sigler, L., Bachewich, J., Angus, A. 2004. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. *Mycologia*, **96**(4):812–821.
- Van Burik, J.A., Magee, P.T. 2001. Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 743–772.
- van Deventer, A.J., van Vliet, H.J., Hop, W.C., Goessens, W.H. 1994. Diagnostic value of anti-Candida enolase antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **32** (1): 17-23.

- Vicentini, A.P., Gesztesi, J.L., Franco, M.F., Souza, W., Moraes, J.Z., Travassos, L.R., Lopes, J.D. 1994. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect. Immun.* **62**:1465–1469.
- Wirta, V. 2003. Analysis of DNA microarray data using the KTH-package and the R environment for statistical computing. <http://www.biotech.kth.se/molbio/microarray>
- Woods, J. 2002. in *Fungal Pathogenesis: Principles and Clinical Applications*, pp. 205–226, Marcel Dekker, New York.
- Wysong D.R., Christin L., Sugar, A.M., Robbins, P.W., Diamond, R.D. 1998. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immun* **66**:1953-1961.
- Yang, Y. H. *et al.* 2002. Statistics for Microarray Analysis (sma), Statistics Department, University of California Berkeley.
- Yu M.L., Limper A.H. 1997. *Pneumocystis carinii* induces ICAM-1 expression in lung epithelial cells through a TNF-alpha mediated mechanism. *Am. J. Physiol.* **272**: L1103–L1111.

## **9. Anexos**

Tabela 1. Genes induzidos e reprimidos de células leveduriformes de *P. brasiliensis* internalizadas por pneumócitos humanos após 48 h de infecção.

<b>Categoria</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>Indução/ Repressão</b>	<b>q-Value (%)</b>
<b><u>Induzidos</u></b>			
<b>Metabolismo de açúcares</b>			
	$\alpha$ -cetogluturato desidrogenase	<b>1.75</b>	0.86
	Reguladores transcricionais do metabolismo de açúcares	<b>1.24</b>	0.0
	Glicoquinase	<b>1.10</b>	0.39
<b>Metabolismo de aminoácidos, proteínas e nitrogênio</b>			
	Proteína Nit, membro da superfamília nitrilase	<b>1.96</b>	0.0
	Precursor da glutamato N-acetiltransferase	<b>1.28</b>	0.37
	Provável precursor mitocondrial da cisteína dessulfurase	<b>1.27</b>	0.0
	Aspartato aminotransferase	<b>1.18</b>	0.35
	Homogentisato 1,2-dioxigenase	<b>1.17</b>	0.75
	Uricase	<b>1.13</b>	0.86
	Provável proteína triptofano periódico	<b>1.11</b>	0.58
<b>Metabolismo de lipídios</b>			
	Precursor da 2,4-dienoil-CoA redutase	<b>1.23</b>	0.0
	Proteína peroxisomal multifuncional de beta-oxidação	<b>1.11</b>	0.46
	Precursor da enoil-CoA hidratase	<b>1.10</b>	1.45
<b>Metabolismo de estéroides</b>			
	Provável proteína de ligação a oxisterol	<b>1.26</b>	0.0
<b>Metabolismo de vitaminas e cofatores</b>			
	Proteína que cataliza a terceira etapa da biossíntese de heme; Hem3p	<b>1.61</b>	0.0
	GTP ciclohidrolase	<b>1.37</b>	0.0
	Proteína biossintética do cofator molibdênio	<b>1.12</b>	0.37
<b>Metabolismo de nucleotídeos</b>			
	Provável fosforilase do nucleosídeo purina orotidina-5'-fosfato decarboxilase; URA3	<b>1.15</b>	0.58
		<b>1.11</b>	0.68
<b>Resposta a estresse</b>			
	Hsp70	<b>1.70</b>	0.0
	prolil-peptidil cis-trans isomerase tipo FKBP 1	<b>1.51</b>	0.0
	NADH ubiquinona oxidorreductase subunidade 19.3 kDa precursor mitocondrial (complexo I-19.3 kDa)	<b>1.45</b>	0.0
	Proteína dnaj	<b>1.25</b>	0.39
	oxidase alternativa	<b>1.24</b>	1.75
	Hsp104	<b>1.24</b>	2.17
	NADH ubiquinona oxidorreductase subunidade 9.5 kDa precursor mitocondrial	<b>1.24</b>	0.92

Provável peptídeo metionina sulfóxido redutase	<b>1.23</b>	0.65
Provável citocromo P450	<b>1.21</b>	0.0
Subunidade beta da flavoproteína de transporte eletrônico	<b>1.20</b>	0.36
NADH ubiquinona oxidorreductase subunidade 23 kDa	<b>1.18</b>	0.0
Cisteína dessulfurase, precursor mitocondrial	<b>1.16</b>	0.83
Citocromo b5	<b>1.13</b>	0.42
Enzima de conjugação de ubiquitina	<b>1.12</b>	0.56
Ligase da proteína ubiquitina [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	<b>1.10</b>	0.67
<b>Citoesqueleto</b>		
Provável proteína que interage com gama tubulina, provável componente dos corpos polares do fuso	<b>1.21</b>	0.87
Proteína relacionada ao componente Tra1 do complexo SAGA	<b>1.18</b>	0.58
Miosina I “myoA”	<b>1.10</b>	1.39
<b>Histonas</b>		
Histona H2A	<b>1.48</b>	0.0
Histona H1	<b>1.47</b>	0.0
<b>Proteínas ribossomais</b>		
Proteína ribossomal 60S L15	<b>1.44</b>	0.55
Proteína ribossomal mitocondrial MRPL9 (YmL9)	<b>1.26</b>	0.56
Componente da subunidade menor de pequeno ribossomo mitocondrial	<b>1.22</b>	0.0
Proteína ribossomal mitocondrial S8	<b>1.14</b>	0.68
<b>Regulação transcricional/traducional</b>		
Subunidade alongadora da RNA polimerase II	<b>1.48</b>	0.0
Componente do fator de transcrição TFIIH; Ssl1p	<b>1.30</b>	0.0
Proteína 10 motivo de ligação a RNA	<b>1.28</b>	0.37
Subunidade de 110 kDa do fator 3 de iniciação (eif3 p110)	<b>1.18</b>	0.0
Proteína relacionada a RNA polimerase II	<b>1.17</b>	0.61
Fator de alongação traducional 3 (eEF-3)	<b>1.16</b>	1.56
Proteína relacionada a PinX1	<b>1.22</b>	4.89
NsdD, proteína de ligação ao DNA	<b>1.21</b>	0.54
Provável fator de alongação traducional EF-Tu	<b>1.10</b>	0.41
<b>Transdução de sinal</b>		
Provável proteína de ligação a GTP	<b>1.89</b>	0.0

Hipotética proteína conservada similar à fosducina	<b>1.24</b>	0.67
Subunidade 7B do complexo COP9/signalossoma	<b>1.22</b>	0.0
<b>Mating (reprodução sexuada)</b>		
Proteína de recombinação meiótica	<b>1.15</b>	0.42
Proteína de “mating type” MAT-1-1	<b>1.13</b>	0.41
<b>Ciclo celular</b>		
Provável homóloga de CDC50	<b>1.50</b>	0.0
Proteína requerida para viabilidade celular	<b>1.21</b>	0.0
Provável proteína 4 supressora da catástrofe mitótica	<b>1.14</b>	0.47
<b>Desidrogenases</b>		
Álcool desidrogenase	<b>1.15</b>	0.62
Provável desidrogenase por similaridade	<b>1.13</b>	0.0
<b>Sintetases/Sintases</b>		
Pantotenato sintetase	<b>1.26</b>	0.0
<b>Fosfatases</b>		
Fosfatase associada a fosfolipídios de membrana	<b>1.15</b>	1.75
<b>Vacuolares/Vesiculares</b>		
ATP sintase vacuolar subunidade G	<b>1.85</b>	0.0
Relacionado a proteína de membrana peroxissomal	<b>1.29</b>	0.0
Provável sinaptobrevina	<b>1.29</b>	0.59
Provável ATPase de transporte de cálcio	<b>1.11</b>	0.45
<b>Resistência a drogas</b>		
Pirazinamidase/nicotinamidase	<b>1.34</b>	0.55
Cassete de ligação a ATP da proteína de transporte multidroga ATRC	<b>1.25</b>	0.37
Proteína de resistência multidroga	<b>1.16</b>	0.74
<b>Proteínas mitocondriais</b>		
ORF hipotética de Mia1p	<b>1.34</b>	0.61
Provável proteína supressora de histona mitocondrial mutante	<b>1.26</b>	0.52
Subunidade de 53 kDa da protease de processamento mitocondrial	<b>1.19</b>	0.59
Translocase 8 da membrana mitocondrial interna	<b>1.15</b>	0.44
<b>Pertencentes a outras categorias funcionais</b>		
Proteína relacionada a hospedeiro-específico toxina AK Akt2	<b>1.26</b>	0.0
Proteína pof1 com repetições F-box/WD	<b>1.25</b>	0.43
Proteína similar a região crítica da síndrome de Down	<b>1.24</b>	0.42

Provável proteína envolvida em autofagia homóloga a apg7 [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	<b>1.21</b>	0.86
Proteína nuclear	<b>1.19</b>	0.65
Proteína hipotética de 11.8 kDa	<b>1.19</b>	0.0
Proteína similar à YNL313C de levedura	<b>1.18</b>	0.37
Enzima relacionada a “lariat-debranching”	<b>1.17</b>	0.92
carboxilesterase	<b>1.16</b>	4.42
Proteína integral de membrana	<b>1.15</b>	1.26
Slx1p	<b>1.14</b>	1.91
Proteína relacionada a isocorismatase	<b>1.10</b>	2.86
Relacionado a fosfoproteína nucleolar	<b>1.10</b>	0.48
<b><u>Reprimidos</u></b>		
<b>Metabolismo de aminoácidos e proteínas</b>		
Provável proteína LST8	<b>0.90</b>	2.97
Glutamina sintase	<b>0.83</b>	0.76
<b>Metabolismo de vitaminas e cofatores</b>		
GTP ciclohidrolase II	<b>0.85</b>	0.0
<b>Parede celular</b>		
Quitina sintase	<b>0.89</b>	0.72
<b>Proteínas ribossomais</b>		
Proteína ribossomal, parte do complexo 60 S	<b>0.89</b>	0.73
Proteína ribossomal 60S L27	<b>0.88</b>	2.58
<b>Transferases</b>		
Sulfato adenililtransferase	<b>0.64</b>	0.0
<b>Sintetases/Sintases</b>		
Pseudouridilato sintase	<b>0.82</b>	0.61
<b>Vacuolares/Vesiculares</b>		
Proteína de “sorting” vacuolar	<b>0.90</b>	2.58
Provável proteína de membrana peroxissomal	<b>0.85</b>	2.58
PMP20 (alérgeno ASPF 3)		
<b>Regulação transcricional/traducional</b>		
Fator de iniciação traducional eIF3	<b>0.88</b>	0.39
Fator de iniciação traducional eIF5	<b>0.83</b>	0.78
Regulador transcricional positivo de enxofre	<b>0.81</b>	0.0
<b>Resposta a estresse</b>		
Componente 1 de resposta ao estresse e integridade da parede celular; Leu 2	<b>0.86</b>	2.58
Catalase isozima P	<b>0.81</b>	0.76
<b>Ciclo celular</b>		
Proteína necessária para o ponto de checagem da fase G2/M	<b>0.85</b>	2.58
<b>Ligases</b>		
Fenilacetil-CoA ligase	<b>0.87</b>	0.39
<b>Hidrolases</b>		
Esterase D/ formilglutamina hidrolase	<b>0.75</b>	0.78

---

**Pertencentes a outras categorias funcionais**

Endonuclease SceI subunidade de 75kDa	<b>0.89</b>	2.28
Provável subunidade alfa tipo 1 de proteassoma	<b>0.87</b>	2.58
Endonuclease de splicing de tRNA	<b>0.86</b>	4.87
Provável chaperonina, tipo complexo-t	<b>0.85</b>	0.76
Proteína hipotética (proteína relacionada a selenoproteína W)	<b>0.85</b>	2.94

---

Tabela 2. Genes up- e down-regulados de células leveduriformes de *P. brasiliensis* internalizadas por pneumócitos humanos após 72 h de infecção.

<b>Categoria</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>Indução/ Repressão</b>	<b>q-Value (%)</b>
<b><u>Induzidos</u></b>			
<b>Metabolismo de açúcares</b>			
	$\alpha$ -cetogluturato desidrogenase	<b>1.28</b>	0.0
	Reguladores transcricionais do metabolismo de açúcares	<b>1.28</b>	0.0
	Glicose-6-fosfato isomerase	<b>1.26</b>	0.0
	Fosfoglicerato quinase	<b>1.18</b>	0.0
	Proteína de repressão de glicose	<b>1.13</b>	0.32
	beta-glicosidase 4	<b>1.11</b>	0.23
	Regulador GPR1 da via do glioxilato	<b>1.11</b>	0.0
	Hexoquinase	<b>1.10</b>	0.43
	Gliceraldeído 3-fosfato-desidrogenase	<b>1.10</b>	0.42
<b>Metabolismo de aminoácidos e proteínas</b>			
	Glutamina sintetase	<b>1.23</b>	0.0
	Arginase	<b>1.18</b>	0.36
	Uricase	<b>1.14</b>	0.67
	Decarboxilase de L-aminoácidos aromáticos	<b>1.13</b>	0.0
	Aspartato aminotransferase	<b>1.11</b>	0.68
<b>Metabolismo de lipídios</b>			
	Precursor de 2,4-dienoil-CoA redutase	<b>1.12</b>	0.0
	Precursor da enoil-CoA hidratase	<b>1.11</b>	0.23
<b>Metabolismo de estéroides</b>			
	Provável proteína de ligação a oxisterol	<b>1.28</b>	0.0
<b>Metabolismo de vitaminas e cofatores</b>			
	Proteína que cataliza a Terceira etapa da biossíntese de heme; Hem3p	<b>1.33</b>	0.0
	GTP ciclohidrolase	<b>1.18</b>	0.0
<b>Metabolismo de nucleotídeos</b>			
	orotidina-5'-fosfato decarboxilase; URA3	<b>1.19</b>	0.0
	Provável fosforilase do nucleosídeo purina	<b>1.16</b>	0.42
<b>Resposta a estresse</b>			
	NADH ubiquinona oxidorreductase subunidade 19.3 kDa, precursor mitocondrial (complexo I- subunidade 19.3 kDa)	<b>1.39</b>	0.0
	prolil-peptidil cis-trans isomerase tipo FKBP 1	<b>1.36</b>	0.0
	Proteína Dnaj	<b>1.26</b>	0.0
	NADH ubiquinona oxidorreductase subunidade de 23 kDa	<b>1.25</b>	0.0

NADH ubiquinona oxidorreductase subunidade de 9.5 kDa	<b>1.22</b>	0.0
Proteína similar à cadeia VIIc de citocromo-c oxidase	<b>1.22</b>	0.0
Subunidade beta de transferência de elétrons da flavoproteína	<b>1.19</b>	0.32
Precursor do polipeptídeo VI da citocromo c oxidase	<b>1.18</b>	0.0
Provável citocromo P450	<b>1.17</b>	0.0
Subunidade VI da citocromo c oxidase	<b>1.16</b>	0.59
Precursor da subunidade flavoproteína da succinato desidrogenase	<b>1.15</b>	0.0
Enzima de conjugação da ubiquitina	<b>1.14</b>	1.52
ATPases envolvidas na partição de cromossomos	<b>1.11</b>	0.0
Citocromo c oxidase subunidade V	<b>1.11</b>	0.34
Oxidase alternativa	<b>1.11</b>	0.82
Mono-oxigenase/desidrogenase tipo P450 [ <i>Aspergillus parasiticus</i> ]	<b>1.11</b>	0.0
Proteína ubiquitina ligase [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	<b>1.10</b>	0.39
<b>Citoesqueleto</b>		
Cinesina (proteína KINA)	<b>1.34</b>	0.0
Componente do complexo de organização de actina ARP2/3	<b>1.20</b>	0.0
Provável proteína que interage com gama tubulina, provável componente dos corpos polares do fuso	<b>1.16</b>	0.0
<b>Histonas</b>		
Histona H1	<b>1.32</b>	0.0
Histona H2A	<b>1.16</b>	0.33
Histona H2B	<b>1.11</b>	0.22
<b>Proteínas ribossomais</b>		
Proteína ribosomal 60S L3	<b>1.19</b>	0.0
Proteína ribosomal 60S L13	<b>1.17</b>	0.0
Proteína ribosomal 60S L23A (L25)	<b>1.15</b>	0.35
Proteína ribosomal 40S S25	<b>1.14</b>	0.0
Proteína ribosomal 40S s3	<b>1.13</b>	1.52
Proteína ribosomal 60S L10-B (L10A)	<b>1.12</b>	0.0
Proteína ribosomal 60S L7a (L8)	<b>1.12</b>	0.38
Proteína ribosomal mitocondrial MRPL9 (YmL9)	<b>1.12</b>	0.43
Proteína ribosomal 60S L24-B	<b>1.11</b>	0.67
<b>Regulação transcricional/traducional</b>		
Subunidade alongadora da RNA polimerase II	<b>1.27</b>	0.0

Proteína 10 motivo de ligação a RNA	<b>1.22</b>	0.0
Provável fator de transcrição dedos de zinco Zn <sub>2</sub> Cys <sub>6</sub>	<b>1.21</b>	0.0
Fator de transcrição dedos de zinco	<b>1.18</b>	0.0
Provável regulador transcricional	<b>1.14</b>	0.38
Proteína relacionada à RNA polimerase II	<b>1.13</b>	0.39
Componente do fator transcricional TFIID da RNA polimerase; Ssl1p	<b>1.11</b>	0.30
Subunidade de 110 kDa do fator de iniciação transcricional eucariótico (eif3 p110)	<b>1.10</b>	1.03
<b>Proteínas Mitocondriais</b>		
Translocase 8 da membrana mitocondrial interna	<b>1.20</b>	0.0
Precursor intermediário da peptidase mitocondrial	<b>1.16</b>	0.0
Provável proteína supressora de histona mitocondrial mutante	<b>1.15</b>	3.43
Provável precursor mitocondrial de cisteína dessulfurase	<b>1.15</b>	0.36
ORF hipotética; Mia1p	<b>1.13</b>	0.58
Componente da subunidade menor do ribossomo mitocondrial	<b>1.12</b>	0.0
<b>Transdução de sinal</b>		
Provável proteína de ligação a GTP	<b>1.89</b>	0.0
Provável proteína de ativação de GTPase; domínio Rap_Gap	<b>1.21</b>	0.39
Histidina quinase	<b>1.18</b>	0.79
Subunidade 7B do complexo COP9/signalossoma	<b>1.13</b>	0.0
Hipotética proteína conservada similar à fosducina	<b>1.13</b>	2.08
Família MAP quinase quinase	<b>1.10</b>	0.32
<b>Mating (reprodução sexuada)</b>		
Proteína de “mating type” MAT-1-1	<b>1.12</b>	0.40
<b>Ciclo celular</b>		
Proteína requerida para viabilidade celular; Ykl082cp	<b>1.14</b>	0.31
<b>Desidrogenases</b>		
Álcool desidrogenase	<b>1.10</b>	0.53
<b>Sintetases/Sintases</b>		
Pantotenato sintetase	<b>1.15</b>	0.0
<b>Fosfatases</b>		
Fosfatase de fosfolípidios associados à membrana	<b>1.12</b>	0.86
<b>Ligases/liases</b>		

DNA Ligase (polideoxirribonucleotídeo sintase [ATP])	<b>1.12</b>	0.44
<b>Vacuolares/Vesiculares</b>		
ATP sintase vacuolar subunidade G	<b>1.42</b>	0.0
Provável sinaptobrevina	<b>1.27</b>	0.0
Relacionado a proteína da membrana peroxissomal	<b>1.18</b>	0.0
<b>Resistência a drogas</b>		
Membro da família de transportadores com cassete de ligação a ATP (ABC)	<b>1.23</b>	0.34
Proteína de resistência multidroga	<b>1.12</b>	0.65
Cassete de ligação a ATP da proteína de transporte multidroga ATRC	<b>1.11</b>	0.31
<b>Pertencente a outras categorias funcionais</b>		
Proteína de ligação a lipídios da ATP sintase de transporte de H <sup>+</sup>	<b>1.33</b>	0.0
Phm7p	<b>1.32</b>	0.0
Proteína relacionada a hospedeiro-específico toxina AK Akt2	<b>1.29</b>	0.0
Proteína similar a região crítica da síndrome de Down	<b>1.25</b>	0.0
Proteína pof1 com repetições F-box/WD	<b>1.25</b>	0.0
12-oxofitodienoato redutase (OPR1)	<b>1.24</b>	0.78
Proteína hipotética de 11.8 kDa	<b>1.21</b>	0.0
Poliproteína	<b>1.21</b>	0.0
Proteína nuclear	<b>1.19</b>	0.65
Proteína hipotética de 11.8 kDa	<b>1.19</b>	0.0
Proteína similar à YNL313C de levedura	<b>1.18</b>	0.37
Enzima relacionada a “lariat-debranching”	<b>1.17</b>	0.92
Did4p	<b>1.17</b>	0.22
Slx1p	<b>1.16</b>	0.23
Carboxilesterase	<b>1.16</b>	4.42
Proteína integral de membrana	<b>1.15</b>	1.26
Slx1p	<b>1.14</b>	1.91
Multicópias do supressor da mutação nula ypt6	<b>1.14</b>	0.83
Provável transcriptase reversa	<b>1.14</b>	0.0
Provável proteína envolvida em autofagia homóloga a apg7 [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	<b>1.13</b>	0.59
Proteína integral de membrana	<b>1.13</b>	2.83
MUS11	<b>1.11</b>	0.43
Relacionada à fosfoproteína nucleolar	<b>1.11</b>	0.34
Provável subunidade 26S da proteinase	<b>1.11</b>	0.68
Proteína MG02621.4 [ <i>Magnaporthe grisea</i> 70-15]	<b>1.11</b>	0.0

Proteína de transporte permease	<b>1.11</b>	1.40
Provável nuclease	<b>1.10</b>	3.57
Proteína relacionada a isocorismatase	<b>1.10</b>	2.86
Relacionado a fosfoproteína nucleolar	<b>1.10</b>	0.48
<b><u>Reprimidos</u></b>		
<b>Metabolismo de açúcares</b>		
Regulador da via do glioxilato	<b>0.88</b>	1.02
Precursor mitocondrial de citrato sintase	<b>0.81</b>	2.93
<b>Metabolismo de aminoácidos e proteínas</b>		
Sarcosina oxidase	<b>0.88</b>	0.0
Aminopectidase B	<b>0.88</b>	0.0
Aminoácido permease	<b>0.86</b>	0.0
Bomba de efluxo metabólico de aminoácidos	<b>0.84</b>	0.69
Acetolactato sintase	<b>0.73</b>	1.02
<b>Metabolismo de lipídios</b>		
Carnitina acetil transferase FacC	<b>0.89</b>	1.81
<b>Resposta a estresse</b>		
Componente 1 de integridade da parede celular e reposta ao estresse; Leu 2	<b>0.89</b>	0.31
Citocromo c heme liase (CCHL)	<b>0.88</b>	0.40
Glutathiona sintetase	<b>0.88</b>	0.33
Proteína induzível por estresse STII	<b>0.87</b>	0.41
Provável peptídio metionina sulfóxido reductase	<b>0.87</b>	0.37
Hsp104	<b>0.75</b>	3.13
Provável ubiquitina ligase	<b>0.67</b>	0.35
<b>Proteínas ribossomais</b>		
Proteína ribossomal 40S S4 (S7)	<b>0.90</b>	2.65
Parte da subunidade ribossomal menor (SSU)	<b>0.89</b>	2.08
Proteína ribossomal 60S L36	<b>0.88</b>	1.48
Proteína ribossomal 60S L9	<b>0.77</b>	0.0
<b>Regulação transcricional/traducional</b>		
Fator de iniciação transcricional eIF-5	<b>0.89</b>	0.32
Regulador transcricional positivo de enxofre	<b>0.88</b>	0.65
<b>Transdução de sinal</b>		
Rho GTPase	<b>0.89</b>	0.37
Proteína tirosina fosfatase	<b>0.88</b>	0.86
Fator de ADP-ribosilação da proteína de ativação de GTPase	<b>0.81</b>	1.19
<b>Desidrogenases</b>		
Provável acil-CoA desidrogenase	<b>0.87</b>	0.0
D-mandelato desidrogenase	<b>0.86</b>	0.42
<b>Sintetases/Sintases</b>		

Pseudouridilato sintase	<b>0.89</b>	0.42
Acetil-coenzima A sintetase (Acetato-CoA ligase)	<b>0.86</b>	0.22
3-oxoacil-sintase [proteína carreadora de acil]	<b>0.72</b>	3.19
Diidropteroato sintase	<b>0.72</b>	0.59
<b>Transferases</b>		
Provável homólogo de tRNA nucleotidiltransferase	<b>0.90</b>	0.42
UDP glucosiltransferase	<b>0.87</b>	1.02
Sulfato adenililtransferase	<b>0.69</b>	0.0
<b>Vesiculares/Vacuolares</b>		
Catepsina D (aspartil protease lisossomal)	<b>0.90</b>	0.0
<b>Ligases/liases</b>		
Fenilacetil-CoA ligase	<b>0.89</b>	0.41
<b>Proteínas mitocondriais</b>		
Carreador de oxodicarboxilato	<b>0.89</b>	1.77
Similar à proteína metaxina da membrana mitocondrial externa de mamíferos	<b>0.88</b>	0.0
<b>Mating (reprodução sexuada)</b>		
Envolvida em transcrição de tipos celulares específicos e resposta a feromônios; Mcm1p	<b>0.82</b>	0.31
<b>Ciclo celular</b>		
Proteína necessária para o ponto de checagem G2/M	<b>0.81</b>	0.0
<b>Pertencentes a outras categorias funcionais</b>		
Proteína conservada similar a YMR310C de <i>S. cerevisiae</i> [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	<b>0.90</b>	2.23
Relacionada à fosfoproteína nucleolar	<b>0.89</b>	1.77
Homóloga ao gene Niemann-Pick tipo C	<b>0.89</b>	0.33
Provável proteína da membrana de Golgi-levedura de fissão	<b>0.88</b>	0.86
Provável proteína de autofagia AUT7	<b>0.88</b>	0.50
Provável ATPase	<b>0.88</b>	1.52
ORF hipotética; Yor006cp	<b>0.87</b>	0.39
Proteína hipotética ( relacionada à selenoproteína W)	<b>0.87</b>	0.0
Proteína 1 do complexo T, subunidade ETA	<b>0.87</b>	0.0
Proteína hipotética conservada provável	<b>0.85</b>	0.0
RNA helicase do fator de splicing de pré-mRNA		
Endonuclease do splicing de tRNA	<b>0.85</b>	0.0
Similar a proteína de ligação a macrofágos e eritroblastos [ <i>Homo sapiens</i> ]	<b>0.85</b>	0.60

Homóloga à proteína específica da fase leveduriforme de <i>Blastomyces</i>	<b>0.81</b>	0.50
ORF hipotética; Yil041 wp [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	<b>0.79</b>	0.23
Proteína de ligação a poli(A)+ RNA	<b>0.74</b>	0.32
Proteína repetida nuc-2 de anquirina	<b>0.74</b>	0.32
Proteína hipotética de 16.8 KD C30D10.04 no cromossomo 2	<b>0.74</b>	1.03
M51	<b>0.69</b>	1.45
Proteína de regulação de nitrogênio OTam	<b>0.67</b>	0.79
Proteína hipotética AN6998.2 [ <i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4]	<b>0.59</b>	0.0
Antígeno imunodominante Gp43	<b>0.53</b>	0.0

Tabela 3. Genes induzidos e reprimidos de células leveduriformes de *P. brasiliensis* internalizadas por pneumócitos humanos após 96 h de infecção.

<b>Categoria</b>	<b>Descrição do gene</b>	<b>Indução/ Repressão</b>	<b>q-Value (%)</b>
<b><u>Induzidos</u></b>			
<b>Metabolismo de açúcares</b>			
	Precursor da subunidade flavoproteína da succinato desidrogenase	<b>1.41</b>	0.0
	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	<b>1.18</b>	0.0
	Fosfoglicerato quinase	<b>1.17</b>	1.09
	Precursor mitocondrial da malato desidrogenase	<b>1.13</b>	2.11
<b>Metabolismo de aminoácidos e proteínas</b>			
	Glutamina sintetase	<b>1.36</b>	0.0
	Arginase	<b>1.26</b>	0.0
	Relacionada à subunidade beta regulatória da metionina adenosiltransferase	<b>1.23</b>	0.0
	Precursor mitocondrial da cisteína dessulfurase	<b>1.20</b>	0.0
	Decarboxilase de L-aminoácidos aromáticos	<b>1.19</b>	0.0
	Precursora da subunidade menor da acetolactate sintase	<b>1.16</b>	0.0
	Proteína envolvida na biossíntese de lisina, proteção contra estresse oxidativo	<b>1.15</b>	0.26
	Cistationina beta-liase	<b>1.13</b>	0.0
<b>Metabolismo de nucleotídeos</b>			
	orotidina-5'-fosfato decarboxilase; URA3	<b>1.25</b>	0.0
	3',5'-fosfodiesterase de nucleotídeos cíclicos de baixa afinidade	<b>1.14</b>	0.0
<b>Resposta a estresse</b>			
	Catalase isozima P	<b>1.36</b>	0.0
	Subunidade VI da citocromo c oxidase	<b>1.23</b>	0.0
	Citocromo c	<b>1.13</b>	0.0
	NADH ubiquinona oxidorreductase subunidade 9.5 kDa	<b>1.13</b>	1.01
	NADH ubiquinona oxidorreductase subunidade 19.3 kDa precursor mitocondrial (complexo I-19.3 kDa)	<b>1.12</b>	0.29
	NADH-citocromo b5 redutase	<b>1.11</b>	2.10
	Provável proteína antioxidante Tsa1 tiol-específica	<b>1.11</b>	0.59

Provável enzima conjugadora de ubiquitina, E2 [ <i>S. pombe</i> ]	<b>1.11</b>	0.0
Subunidade beta da flavoproteína de transferência de elétrons	<b>1.10</b>	2.95
<b>Citoesqueleto</b>		
Componente do complexo de organização da actina ARP2/3	<b>1.12</b>	1.02
Proteína relacionada ao componente Tra1 do complexo SAGA	<b>1.15</b>	0.0
<b>Histonas</b>		
Histona H2B	<b>1.41</b>	0.0
Histona H4	<b>1.32</b>	0.0
Histona H3	<b>1.25</b>	0.0
Histona H2A	<b>1.18</b>	0.0
Histona H1	<b>1.18</b>	0.0
<b>Proteínas ribossomais</b>		
Proteína ribossomal 40S S25	<b>1.27</b>	0.0
Proteína ribossomal 60S L10-B (L10A)	<b>1.24</b>	0.0
Proteína ribossomal 60S L13	<b>1.23</b>	0.0
Proteína ribossomal 60S L7a (L8)	<b>1.19</b>	0.0
Proteína ribossomal 60S L19	<b>1.19</b>	0.0
40s ribossomal S28	<b>1.18</b>	0.0
Proteína ribossomal L16a	<b>1.18</b>	0.0
Provável proteína ribossomal 60S RPL4A	<b>1.17</b>	0.0
Proteína ribossomal 40S S3AE	<b>1.17</b>	0.0
Proteína ribossomal 60S L20	<b>1.16</b>	0.0
Proteína ribossomal 60S L27	<b>1.16</b>	0.0
Provável proteína ribossomal Rps8bp	<b>1.15</b>	0.0
Proteína ribossomal 60S L18	<b>1.14</b>	0.0
Proteína ribossomal 60S L11	<b>1.14</b>	0.28
Proteína ribossomal S5	<b>1.14</b>	0.51
Proteína ribossomal 40S s8	<b>1.14</b>	1.91
Proteína ribossomal L21A	<b>1.14</b>	0.0
Proteína ribossomal 40S S11	<b>1.13</b>	0.0
Proteína ribossomal 60S L23A (L25)	<b>1.13</b>	2.95
Proteína ribossomal 40S s9	<b>1.13</b>	0.90
Proteína ribossomal 60S L24-B	<b>1.12</b>	1.95
Provável proteína ribossomal L15.e.B, citosólica	<b>1.12</b>	0.0
Proteína ribossomal 60S L24	<b>1.11</b>	0.0
Proteína ribossomal 40S S12	<b>1.11</b>	0.0
Proteína ribossomal 40S S17	<b>1.11</b>	1.17
Proteína ribossomal 60S L18	<b>1.11</b>	0.0
Proteína ribossomal 40S S27	<b>1.10</b>	0.0

<b>Regulação transcricional/traducional</b>		
Subunidade de 110 kDa de eif3	<b>1.24</b>	0.0
Provável fator transcricional dedos de zinco Zn <sup>2</sup> Cys <sub>6</sub>	<b>1.23</b>	0.0
Provável regulador transcricional	<b>1.18</b>	0.0
Fator de transcrição eucariótico 4A (eIF-4A)	<b>1.15</b>	0.0
Fator de alongação traducional EF-1 alfa	<b>1.14</b>	0.47
Cadeia gama do fator de alongação da transcrição eEF1	<b>1.13</b>	0.28
Provável fator de iniciação da transcrição eucariótica eif-3	<b>1.12</b>	0.28
Regulador pós-transcricional csx1 de ligação a RNA	<b>1.12</b>	0.0
Subunidade de alongação da RNA polimerase II	<b>1.10</b>	0.43
<b>Transdução de sinal</b>		
Provável proteína de ligação a GTP	<b>1.89</b>	0.0
Provável ATPase tipo P de cálcio	<b>1.45</b>	0.0
Subunidade 7B do complexo COP9/signalossoma	<b>1.22</b>	0.0
Hipotética proteína conservada similar à fosducina	<b>1.24</b>	0.67
Histidina quinase	<b>1.24</b>	0.0
Família MAP quinase quinase	<b>1.22</b>	0.0
Proteína nuclear/nucleolar de ligação a GTP	<b>1.19</b>	0.0
Proteína de ativação de Rho GAP GTPase	<b>1.14</b>	0.61
Subunidade catalítica da proteína quinase dependente de cAMP	<b>1.13</b>	0.0
Adenilato quinase (GTP mitocondrial: AMP fosfotransferase)	<b>1.10</b>	2.60
<b>Ciclo celular</b>		
Cinesina (proteína KINA)	<b>1.19</b>	0.45
Proteína homóloga a CDC20	<b>1.18</b>	0.0
Relacionado à subunidade 10 do complexo promotor de anáfase	<b>1.15</b>	0.57
<b>Desidrogenases</b>		
Monooxigenase/desidrogenase tipo P450 [ <i>Aspergillus parasiticus</i> ]	<b>1.23</b>	0.0
Álcool desidrogenase	<b>1.20</b>	0.0
Aldeído desidrogenase ALDH1	<b>1.17</b>	1.08
Provável álcool desidrogenase oxidoreductase zinco-dependente	<b>1.15</b>	0.28

Relacionado à piruvato desidrogenase quinase	<b>1.10</b>	0.0
<b>Transferases</b>		
3-oxoácido-CoA transferase	<b>1.20</b>	0.51
N-glicosil-transferase	<b>1.18</b>	0.0
Acetil-CoA acetiltransferase	<b>1.18</b>	0.0
Provável glicosil transferase	<b>1.17</b>	0.0
Acetiltransferase	<b>1.14</b>	0.0
Proteína do retículo endoplasmático que transfere Glc-Nac-P de UDP-GlcNac para Dol-P	<b>1.14</b>	0.0
Provável manosiltransferase	<b>1.12</b>	0.0
Glutamina fosforribosilpirofosfato amidotransferase	<b>1.12</b>	0.47
Tirosil-tRNA sintetase citoplásmica	<b>1.10</b>	0.0
<b>Sintetases/Sintases</b>		
Subunidade alfa da ATP sintase tipo FOF1	<b>1.18</b>	0.0
Subunidade H da ATP sintase	<b>1.13</b>	0.28
S-adenosilmetionina sintetase	<b>1.11</b>	3.99
<b>Fosfatases</b>		
Subunidade regulatória de 65 kD da proteína fosfatase 2a	<b>1.22</b>	0.0
Homólogo 1 da proteína fosfatase 2C (PP2C-1)	<b>1.12</b>	1.03
<b>Vacuolares/vesiculares</b>		
Receptor de “sorting” de proteína vacuolar para carboxipeptidase Y e proteinase A; relacionado à sortilina;	<b>1.15</b>	0.60
<b>Parede celular</b>		
imidase; predita xilanase/quitina deacetilase	<b>1.22</b>	0.0
<b>Resistência a drogas</b>		
Membro da família de transportadores de cassete de ligação a ATP (ABC)	<b>1.14</b>	2.42
<b>Proteínas Mitocondriais</b>		
ORF hipotética de Mia1p	<b>1.34</b>	0.61
Provável proteína supressora de histona mitocondrial mutante	<b>1.23</b>	0.0
Subunidade de 53 kDa da protease de processamento mitocondrial	<b>1.19</b>	0.59
translocase 8 da membrana mitocondrial interna	<b>1.15</b>	0.44
Precursor mitocondrial da homocitrato sintase	<b>1.10</b>	2.00

<b>Pertencente a outras categorias funcionais</b>		
Poliproteína	<b>1.43</b>	0.0
Proteína integral de membrana	<b>1.33</b>	0.0
Elemento retrotransponível L1	<b>1.29</b>	0.0
Provável transcriptase reversa	<b>1.28</b>	0.0
Proteína de ligação a lipídio da ATP sintase de transporte de H	<b>1.22</b>	0.0
MUS11	<b>1.19</b>	0.0
Provável fosfomanomutase	<b>1.18</b>	0.0
Provável ciclofilina associada a U-snRNP	<b>1.18</b>	0.0
Provável subunidade 26S da proteinase	<b>1.18</b>	0.27
Provável subunidade alfa tipo do proteassoma	<b>1.16</b>	0.0
Pode codificar uma proteína envolvida em uma ou mais etapas mono-oxigenase ou hidroxilase da biossíntese de ubiquitina	<b>1.13</b>	0.0
Provável RNA helicase DEAD-box	<b>1.13</b>	0.0
Acumulação de DYads; predita proteína de membrana	<b>1.13</b>	0.58
Proteína relacionada a hospedeiro-específico toxina AK Akt2	<b>1.11</b>	0.47
Pequena proteína com tetratricopetídeos repetidos e tica em glicina	<b>1.11</b>	0.0
Similar a proteína induzida por UV da levedura de fissão	<b>1.11</b>	0.0
Regulador negative de URS2 do promotor HO	<b>1.10</b>	2.83
<b><u>Reprimidos</u></b>		
<b>Metabolismo de aminoácidos e proteínas</b>		
Provável leucina carboxil metiltransferase	<b>0.90</b>	0.75
Sarcosina oxidase	<b>0.90</b>	0.89
Aminoácido permease	<b>0.89</b>	0.0
Precursor da glutamato N-acetiltransferase	<b>0.86</b>	0.0
Homogentisato 1,2-dioxigenase	<b>0.86</b>	1.56
Provável peptídeo metionina sulfóxido redutase	<b>0.85</b>	0.0
Bomba de efluxo metabólico de aminoácidos	<b>0.73</b>	0.49
<b>Metabolismo de lipídios</b>		

	Carnitina acetil transferase FacC	<b>0.89</b>	1.56
	Precursor mitocondrial da citrato sintase	<b>0.73</b>	1.31
<b>Resposta ao estresse</b>			
	Proteína induzida por estresse STI1	<b>0.82</b>	0.0
	Oxidase alternativa	<b>0.81</b>	0.0
	HSP104	<b>0.71</b>	0.49
	Provável ubiquitina ligase	<b>0.63</b>	0.27
<b>Proteínas ribossomais</b>			
	Proteína ribossomal L14	<b>0.89</b>	1.12
	Proteína ribossomal 40S S4 (S7)	<b>0.83</b>	1.14
	Proteína ribossomal 60S L9	<b>0.77</b>	0.0
<b>Regulação transcricional/traducional</b>			
	Fator de iniciação transcricional eIF3	<b>0.90</b>	0.0
	Proteína de ligação a poli-A+RNA	<b>0.73</b>	1.05
<b>Transdução de sinal</b>			
	Provável ATPase de cálcio tipo P	<b>0.89</b>	4.49
	Tirosina fosfatase	<b>0.86</b>	1.06
<b>Desidrogenases</b>			
	Provável acil-CoA desidrogenase	<b>0.89</b>	0.0
	D-mandelato desidrogenase	<b>0.81</b>	0.0
<b>Sintetases/Sintases</b>			
	Acetil-coenzima A sintetase (Acetato-CoA ligase)	<b>0.89</b>	1.32
	Pseudouridilato sintase	<b>0.83</b>	0.0
	Metilcitrato sintase	<b>0.71</b>	0.0
	Acetolactato sintase	<b>0.65</b>	0.0
	Diidropteroato sintase	<b>0.61</b>	0.0
<b>Fosfatases</b>			
	Fosfo-serina fosfatase	<b>0.90</b>	0.0
<b>Vacuolares/Vesiculares</b>			
	Proteína de “sorting” vacuolar; Vps55p	<b>0.95</b>	4.98
<b>Resistência a drogas</b>			
	Proteína hipotética similar a YCR017C; proteína integral de membrana envolvida em sensibilidade a drogas	<b>0.90</b>	2.60
	Provável transportador ABC	<b>0.86</b>	0.26
<b>Mating</b>			
	Envolvida em transcrição de tipo celular específico e resposta a feromônios; Mcm1p	<b>0.87</b>	0.46
<b>Ligases/liases</b>			
	Fenilacetil-CoA ligase	<b>0.86</b>	0.61

<b>Citoesqueleto</b>		
Relacionado ao componente Tra1 do complexo SAGA	<b>0.90</b>	2.11
<b>Ciclo celular</b>		
Proteína necessária para o ponto de checagem G2/M	<b>0.83</b>	0.0
Provável homólogo de CDC50	<b>0.78</b>	0.0
<b>Pertencente a outras categorias funcionais</b>		
Provável ATPase	<b>0.90</b>	2.15
Similar a proteína de <i>C. elegans</i> ;	<b>0.90</b>	0.0
Proteína homóloga ao N-terminal de epsina	<b>0.89</b>	3.87
Proteína de ligação a DNA NsdD	<b>0.89</b>	0.44
Regulador do desenvolvimento flbA	<b>0.89</b>	0.0
Provável proteína da membrana de Golgi- levedura de fissão	<b>0.88</b>	2.51
Similar à proteína de ligação a macrófagos e eritroblastos [Homo sapiens]	<b>0.87</b>	0.49
ORF hipotética; Yil041wp [Saccharomyces cerevisiae]	<b>0.78</b>	0.0
Proteína hipotética de 16.8 kDa C30D10.04 no cromossomo II	<b>0.74</b>	1.11