



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

**Caracterização do transcrito parcial do fungo  
patogênico *Fonsecaea pedrosoi***

**Miguel Campelo de Melo Ferraz**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ildinete Silva Pereira  
Coorientador: Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca**

**Brasília, 2011**



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

**Caracterização do transcrito parcial do fungo  
patogênico *Fonsecaea pedrosoi***

**Miguel Campelo de Melo Ferraz**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ildinete Silva Pereira  
Coorientador: Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca**

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biologia Molecular.

**Brasília, 2011**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular, da Universidade de Brasília, sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ildinete Silva Pereira e coorientação do Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca.

**Banca Examinadora:**

**Titulares:**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ildinete Silva Pereira (presidente)

Departamento de Biologia Celular

Universidade de Brasília (UnB)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Karen Spadari Ferreira (examinador externo)

Departamento de Ciências Biológicas

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) - Campus de Diadema / SP

Dr.<sup>a</sup> Patrícia Albuquerque (examinador interno)

Departamento de Biologia Celular

Universidade de Brasília (UnB)

**Suplente:**

Dr. Marciano Régis Rubini (examinador interno)

Departamento de Biologia Celular

Universidade de Brasília (UnB)

"Descobrir é ver o que todo mundo viu e pensar no que ninguém pensou."

Albert von Szent-Györgyi Nagrapolt, Prêmio Nobel de Medicina 1937

Aos meus pais, irmãos, amigos e à torcida do Mengão.

## **Agradecimentos**

A Deus e a Nossa Senhora, pelas bênçãos recebidas;

Aos professores Ildinete e Marcio, pela orientação, apoio e paciência;

Ao Marciano e à Ana Carolina, que foram imprescindíveis na execução dos experimentos;

À Adriane, pelo empenho no sequenciamento;

Ao Marcus Teixeira, pelo apoio;

Aos demais professores do Departamento de Biologia Celular, especialmente Lídia e Marcelo Brígido;

Aos estudantes do laboratório 3, especialmente Tatiana, Robson, Natália, Mariana, Calliandra, Daniel, Lorena e Thiago;

Aos estudantes dos laboratórios 0, 1, 2 e 4, que sempre foram muito solícitos, especialmente Yuri, Thayana, Vinícius, Osmar, Carol, Érica, Larissa e Walter;

Aos técnicos do laboratório Dona Fátima, Dona Ivanilde, Thompson, Aldaíde e Samuel, pela dedicação e exemplo;

A minha família e aos amigos;

À CAPES, pelo apoio financeiro.

# Índice

<b>Índice de figuras</b>	<b>ix</b>
<b>Índice de tabelas</b>	<b>x</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xiv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 O fungo <i>Fonsecaea pedrosoi</i> e a Cromoblastomicose	1
1.2 Distribuição geográfica	2
1.3 Epidemiologia	3
1.4 Diagnóstico	5
1.5 Curso clínico	7
1.6 Tratamento	8
1.7 Imunologia	9
1.8 Diferenciação celular de <i>F. pedrosoi</i>	12
1.9 Virulência de <i>F. pedrosoi</i>	14
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>18</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
3.1 Geral	20
3.2 Específicos	20
<b>4. MATERIAL</b>	<b>21</b>
4.1 Meios de cultura para <i>F. pedrosoi</i>	21
4.2 Meios de cultura para <i>E. coli</i>	21
4.3 Meios e soluções para a extração de DNA plasmidial (mini-preparação)	22
4.4 Antibiótico	23
4.5 Soluções para eletroforese em géis de agarose	24
4.6 Enzimas	24
4.8 Marcador de massa molecular (MM)	25
	vii



4.9	Oligonucleotídios sintéticos	26
4.10	Microorganismo utilizado	26
4.11	Plasmídeo utilizado	27
4.12	Kits utilizados	27
<b>5.</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>29</b>
5.1	Cultivo do fungo <i>F. pedrosoi</i>	29
5.2	Extração de RNA total de <i>F. pedrosoi</i>	29
5.3	Purificação de RNA poli A <sup>+</sup> de <i>F. pedrosoi</i>	30
5.4	Construção da biblioteca de cDNA de <i>F. pedrosoi</i>	30
5.4.1	Síntese da primeira fita de cDNA	32
5.4.2	Síntese da segunda fita de cDNA	32
5.4.3	Adição de adaptadores <i>Sal</i> I	33
5.4.4	Digestão com <i>Not</i> I	33
5.4.5	Fracionamento de cDNA por cromatografia em coluna	33
5.4.6	Ligação de cDNA a pSPORT 1	36
5.4.7	Precipitação do sistema de ligação	36
5.5	Transformação por eletroporação	36
5.6	PCR de colônia dos clones transformados	37
5.7	Minipreparação de DNA Plasmidial em Placa <i>Deep Well</i>	38
5.8	Amplificação e sequenciamento da biblioteca de cDNA de <i>F. pedrosoi</i>	39
5.9	Análise das sequências de cDNA de <i>F. pedrosoi</i>	41
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
6.1	Extração de RNA total de <i>F. pedrosoi</i>	49
6.2	Construção da biblioteca de cDNA de <i>F. pedrosoi</i>	49
6.3	Representatividade da biblioteca de cDNA	51
6.4	Análise das sequências de cDNA de <i>F. pedrosoi</i>	52
<b>7.</b>	<b>PRINCIPAIS RESULTADOS E CONCLUSÕES</b>	<b>94</b>
<b>8.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>95</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>96</b>
<b>10.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>100</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Exame hispatológico direto de paciente com cromoblastomicose por <i>F. pedrosoi</i> .	5
<b>Figura 2.</b> Tipos de conidiação de <i>F. pedrosoi</i> .	6
<b>Figura 3.</b> Lesões polimórficas da cromoblastomicose.	8
<b>Figura 4.</b> Sumário e fluxograma das etapas do kit “SuperScript™ Plasmid System”.	31
<b>Figura 5.</b> Esquema dos principais passos empregados para a geração e análise de ESTs de <i>F. pedrosoi</i> .	42
<b>Figura 6.</b> <i>Basecalling</i> de eletroferogramas gerados após o sequenciamento automático examinados pelo KB Basecaller.	43
<b>Figura 7.</b> Resultado da análise da sequência D04(3) de <i>F. pedrosoi</i> pelo programa Vecscreen.	44
<b>Figura 8.</b> Esquema ilustrando a geração e agrupamento das ESTs de <i>F. pedrosoi</i> .	45
<b>Figura 9.</b> Perfil eletroforético da amostra de RNA total de <i>F. pedrosoi</i> .	49
<b>Figura 10.</b> Perfil eletroforético das amostras de cDNA; RNA poli A <sup>-</sup> e RNA total de <i>F. pedrosoi</i> .	50
<b>Figura 11.</b> Perfil eletroforético dos produtos da PCR a partir do DNA plasmidial de clones recombinantes de <i>E. coli</i> DH10B.	51
<b>Figura 12.</b> Perfil eletroforético do DNA plasmidial de clones da biblioteca de cDNA de <i>F. pedrosoi</i> .	51
<b>Figura 13.</b> Agrupamento em <i>singlets</i> e <i>contigs</i> das sequências de <i>F. pedrosoi</i> , e análise de similaridade com sequências do NCBI.	52
<b>Figura 14.</b> Caracterização do transcritoma parcial de <i>F. pedrosoi</i> .	53
<b>Figura 15.</b> Mecanismos de homeostase de zinco em fungos.	58
<b>Figura 16.</b> Esquema da ETC na matriz mitocondrial.	65
<b>Figura 17.</b> Esquema da ETC em mitocôndria de fungos.	68
<b>Figura 18.</b> Resultado da análise por Blastx da <i>contig7</i> de <i>F. pedrosoi</i> .	72
<b>Figura 19.</b> Reações enzimáticas do ciclo do glioxalato e do ciclo do ácido cítrico.	78

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Frações de cDNA de <i>F. pedrosoi</i> eluídas por cromatografia em coluna.	35
<b>Tabela 2.</b> Sequências de cDNA de <i>F. pedrosoi</i> anotadas como proteínas transportadoras pela análise de similaridade por Blastx.	54
<b>Tabela 3.</b> Sequências de cDNA de <i>F. pedrosoi</i> anotadas como proteínas estruturais pela análise de similaridade por Blastx.	61
<b>Tabela 4.</b> Sequências de cDNA de <i>F. pedrosoi</i> anotadas como proteínas envolvidas na respiração celular pela análise de similaridade por Blastx.	64
<b>Tabela 5.</b> Sequências de cDNA de <i>F. pedrosoi</i> anotadas como proteínas relacionadas ao estresse oxidativo pela análise de similaridade por Blastx.	66
<b>Tabela 6.</b> Sequências de cDNA de <i>F. pedrosoi</i> anotadas como proteínas envolvidas no Ciclo do Glioxalato pela análise de similaridade por Blastx.	76
<b>Tabela 7.</b> Sequências de cDNA de <i>F. pedrosoi</i> anotadas como proteínas de choque térmico pela análise de similaridade por Blastx.	82
<b>Tabela 8.</b> Sequências de cDNA de <i>F. pedrosoi</i> anotadas como proteínas do metabolismo de carboidratos pela análise de similaridade por Blastx.	90
<b>Tabela 9.</b> Sequências de cDNA de <i>F. pedrosoi</i> anotadas como proteínas diversas pela análise de similaridade por Blastx.	92
<b>Tabela 10.</b> Sequências de cDNA de <i>F. pedrosoi</i> anotadas como proteínas envolvidas na degradação de proteínas pela análise de similaridade por Blastx.	96
<b>Tabela 11.</b> Sequências de cDNA de <i>F. pedrosoi</i> anotadas como fatores de transcrição e tradução pela análise de similaridade por Blastx.	97
<b>Tabela 12.</b> Sequências de cDNA de <i>F. pedrosoi</i> anotadas como proteínas do metabolismo de aminoácidos pela análise de similaridade por Blastx.	98
<b>Tabela 13.</b> Sequências de cDNA de <i>F. pedrosoi</i> anotadas como proteínas do metabolismo de lipídios pela análise de similaridade por Blastx.	99
<b>Tabela 14.</b> Sequências de cDNA de <i>F. pedrosoi</i> anotadas como proteínas do metabolismo de vitaminas e cofatores pela análise de similaridade por Blastx.	99

## Lista de abreviaturas

A <sub>260</sub>	Absorbância a 260 nm
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
aa	Resíduo de aminoácido
°C	Graus Celsius
cDNA	DNA complementar
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos 5'-trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático de adsorção
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i> (Etiqueta de Sequência Expressa)
g	Grama
g	Força gravitacional
h	Hora
HLA	Sistema Antígeno Leucocitário Humano
Hsp	<i>Heat shock proteins</i> (Proteínas de choque térmico)
IPTG	Isopropil-tio-β-D-galactosídeo
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> (Espaçador Interno Transcrito)
kb	Kilobases
kV	Kilovolts
kDa	Kilodaltons
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramma
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Massa Molecular

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OD <sub>260</sub>	Densidade ótica a 260
PCR	Reação de polimerização em cadeia
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
mRNA poli (A) <sup>+</sup>	Ácido ribonucléico mensageiro com cauda poli A
ms	Milisegundo
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
pg	Picograma
pb	Pares de base
pmol	Picomoles
p/v	Peso/Volume
QV	<i>Quality value</i> (Valor de qualidade de leitura)
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse	Ribonuclease
RNA poli (A) <sup>-</sup>	Ácido ribonucleico sem cauda poli A
rpm	Rotações por minuto
S	Coeficiente de sedimentação (unidade em Svedberg, S)
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
tRNA	Ácido ribonucléico transportador
UV	Radiação ultravioleta
v	Volume
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-inodoxil-β-D-galactopiranosídeo
μF	Microfaraday
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
%	Por Cento
Ω	Resistência elétrica em Ohms

## RESUMO

*Fonsecaea pedrosoi* é um fungo dimórfico, caracterizado pelas formas saprofítica/reprodutiva (micélio/conídio) e infecciosa (corpos escleróticos), pertencente à família *Dematiaceae*. Habita o solo, plantas e matéria orgânica em decomposição. Encontra-se em todos os continentes, mais comumente em regiões tropicais e subtropicais da América, Ásia e África. *F. pedrosoi* é o principal agente etiológico da cromoblastomicose, uma doença infecciosa crônica da pele e do tecido subcutâneo. No Brasil, essa doença é endêmica na região Amazônica. A infecção ocorre por implantação traumática transcutânea de conídios e fragmentos de hifa do fungo, acometendo principalmente trabalhadores rurais. Poucos são os dados a respeito da biologia molecular de *F. pedrosoi* disponíveis na literatura científica. Informações a respeito da expressão gênica são essenciais à compreensão do mecanismo de interação patógeno-hospedeiro e para o desenho de novas estratégias terapêuticas e de drogas específicas. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi a construção de uma biblioteca de cDNA de *F. pedrosoi*, seguido do sequenciamento de clones de cDNA dessa biblioteca e da respectiva geração de um banco de sequências expressas (ESTs, *Expressed Sequence Tags*). Dentre 480 ESTs analisadas, empregando ferramentas convencionais de bioinformática (*pipeline* disponível *on-line*: <http://helix.biomol.unb.br/php/index.html>), 353 sequências de nucleotídeos distintas foram selecionadas segundo os parâmetros específicos estabelecidos (QV > 20 e extensão > 100 bases). Destas, 139 sequências apresentaram similaridade com sequências depositadas em banco de dados, dentre as quais destacam-se genes de transportadores de íons, transportadores de drogas, enzimas envolvidas na respiração celular, proteínas de parede celular e proteínas de choque térmico.

## ABSTRACT

*Fonsecaea pedrosoi* is a dimorphic fungus, characterized by saprophytic/reproductive (mycelium/conidia) and infectious forms (sclerotic bodies) belonging to the family *Dematiaceae*. Inhabits soil, plants and decaying organic matter. It is found in all continents, most commonly in tropical and subtropical America, Asia and Africa. *F. pedrosoi* is the major etiologic agent of chromoblastomycosis, a chronic infectious disease of the skin and subcutaneous tissue. In Brazil, this disease is endemic in the Amazon region. Infection occurs by traumatic transcutaneous implantation of conidia and hyphae fragments of the fungus, affecting mainly rural workers. There are few data regarding the molecular biology of *F. pedrosoi* available in scientific literature. Information on the gene expression is essential to understanding the mechanism of host-pathogen interaction and for designing new therapeutic strategies and specific drugs. Thus, the purpose of this study was to construct a cDNA library of *F. pedrosoi*, followed by sequencing of cDNA clones in this library and the generation of a database of expressed sequence tags (ESTs). Of 480 ESTs analyzed, using conventional tools of bioinformatics (pipeline available online: <http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>), 353 distinct nucleotide sequences were selected according to specific parameters established (QV > 20 and length > 100 bases). Of these, 139 sequences showed similarity to sequences stored in databases, among which stand out genes of ion transporters, drug transporters, enzymes involved in cellular respiration, cell wall proteins and heat shock proteins.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O fungo *Fonsecaea pedrosoi* e a Cromoblastomicose

*Fonsecaea pedrosoi* é um fungo dimórfico, de parede celular com pigmentação escura, pertencente à família *Dematiaceae* (Cooper *et al.*, 1985). Saprófito na natureza, habita o solo, plantas e matéria orgânica em decomposição. Em humanos, juntamente com outros fungos demáceos, como *Phialophora verrucosa*, *Cladophialophora carrionii* e *Rhinocladiella aquaspersa*, causa a cromoblastomicose (Bonifaz *et al.*, 2001). *F. pedrosoi* é o principal agente etiológico de cromoblastomicose no mundo, principalmente em países subtropicais e tropicais, como o Brasil (Hamza *et al.*, 2003). O dimorfismo de *F. pedrosoi* é caracterizado pelas formas saprofítica/reprodutiva (micélio/conídios) e parasitária, onde o fungo diferencia-se em células escleróticas durante a infecção no hospedeiro (Silva, 1957). Sua pigmentação escura deve-se ao fato do fungo produzir melanina de modo constitutivo (Ellis *et al.*, 1974). *F. pedrosoi* possui uma espessa camada de melanina na parede celular, que lhe confere integridade estrutural e proteção contra células efetoras do sistema imune do hospedeiro (Alviano *et al.*, 1991). A persistência do fungo demáceo dentro do hospedeiro causa a cromoblastomicose.

A cromoblastomicose é uma doença infecciosa crônica que acomete na maior parte dos casos a pele e o tecido subcutâneo do paciente infectado. Foi descrita pela primeira vez em 1914, com o nome de “figueira”, pelo médico alemão radicado no Brasil, Max W. Rudolph, que teria estudado seis casos da doença na cidade de Estrela do Sul, MG, Brasil (Rudolph, 1914). Em 1911, o pesquisador brasileiro Alexandrino Pedroso observou em São Paulo o primeiro caso de cromoblastomicose por *Phialophora verrucosa*, embora só viesse a publicar o registro em um jornal brasileiro em 1920, em colaboração com Gomes (Pedroso & Gomes, 1920). Em 1915, os pesquisadores americanos Medlar e Lane publicaram as primeiras observações clínicas da doença, isolando culturas positivas de *P. verrucosa* (Medlar, 1915; Lane, 1915). Terra *et al.* (1922) definiram a patologia como uma dermatite verrucosa causada por fungos pigmentados, denominando-a “cromoblastomicose”. Carrion, em 1935, isolou



um novo agente etiológico da doença, *Fonsecaea compacta*. Em 1936, Negróni descobriu a espécie *Fonsecaea pedrosoi*, o agente etiológico universal da cromoblastomicose. Trejos (1954) fez a descoberta do fungo demáceo *Cladosporium carrionii*. E finalmente, Schell *et al.* (1983) isolaram *Rhinocladiella aquaspersa*, outro agente etiológico da cromoblastomicose.

Na cromoblastomicose, a infecção geralmente ocorre por implantação traumática transcutânea de conídios e fragmentos de hifa do fungo demáceo. A doença é dita como ocupacional, pois afeta geralmente trabalhadores rurais que não estão protegidos adequadamente quando manuseiam o solo, vegetais e matéria orgânica - habitats naturais do fungo. Existem relatos de trabalhadores rurais infectados que se feriram com espinhos e lascas de madeira contaminadas com *F. pedrosoi* (Salgado *et al.*, 2004). Embora em casos raros, já foram relatadas outras vias de infecção na cromoblastomicose, como a inalação de esporos do fungo e a disseminação hematogênica (Howard *et al.*, 1991).

## **1.2 Distribuição geográfica**

Os casos diagnosticados de cromoblastomicose abrangem todos os continentes, mas com incidência maior em regiões tropicais e subtropicais da América, Ásia e África (Rippon, 1988; Kwon-Chung & Bennett, 1992; Brandt & Warnock, 2003). Brasil, México, Venezuela, Japão e Madagascar são alguns dos países com as maiores taxas de acometimento por cromoblastomicose (Silva *et al.*, 1999; Minotto *et al.*, 2001; Bonifaz *et al.*, 2001; Perez-Blanco *et al.*, 2006; Fukushiro, 1983; Esterre *et al.*, 1996). No Brasil, a região Amazônica é considerada a principal área endêmica da cromoblastomicose (Silva *et al.*, 1999).

### 1.3 Epidemiologia

Estudos epidemiológicos mostram que a cromoblastomicose afeta indivíduos de qualquer idade, sendo rara antes da adolescência, e mais comum em adultos com mais de 30 anos. A incidência em indivíduos mais velhos pode ser explicada pela cronicidade da doença. A manifestação da cromoblastomicose pode demorar vários anos após a infecção do paciente (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Silva *et al.*, 1999; Brandt & Warnock, 2003). E após a manifestação, a doença pode se desenvolver por um longo período, dificultando, dessa maneira, o tratamento. Pacientes com cromoblastomicose, de baixa renda e pouca instrução escolar, geralmente demoram a buscar tratamento, contribuindo para o agravamento das lesões e consequentemente diminuindo a chance de sucesso do tratamento. Além disso, os tratamentos são pouco acessíveis para os pacientes de áreas rurais; centros clínicos são distantes; o tratamento é dispendioso e demorado.

No Brasil, segundo o IBGE, o censo populacional de 2000 apontava uma população rural de 31,9 milhões de habitantes e uma estimativa de acometimento por cromoblastomicose de 1/196 mil habitantes, o que levaria, à época, a cerca de 163 mil habitantes com a doença (0,51% da população rural brasileira) (Ribeiro *et al.*, 2006). O censo populacional de 2010 divulgado pelo IBGE revelou um decréscimo de 2 milhões de habitantes na população rural. A estimativa da taxa de acometimento de 2010 pela cromoblastomicose não foi divulgado. Caso a incidência se mantivesse igual à do ano 2000, teríamos cerca de 153 mil habitantes com a doença, o que ainda representa uma micose subcutânea de relevância na saúde pública do País.

A cromoblastomicose ocorre predominantemente em homens; 78 a 82 % dos pacientes com cromoblastomicose são do sexo masculino (Minotto *et al.*, 2001; Pretelt, 1989). Silva *et al.* (1999), em um estudo retrospectivo de 325 casos de cromoblastomicose diagnosticados ao longo de 55 anos na região Amazônica, revelou que a faixa etária de maior incidência da doença era de indivíduos entre 41 e 70 anos, sendo 86% agricultores rurais, 93% do sexo masculino e 81% com lesões nos membros inferiores (pernas e pés). Dos casos diagnosticados, 62% foram confirmados por

exames laboratoriais, considerando a forma tecidual para análise histopatológica. Em 24% dos pacientes (78 casos), o agente etiológico foi isolado e identificado por meio de cultura. *F. pedrosoi* foi responsável por 77 casos, enquanto *Phialophora verrucosa*, por apenas um caso.

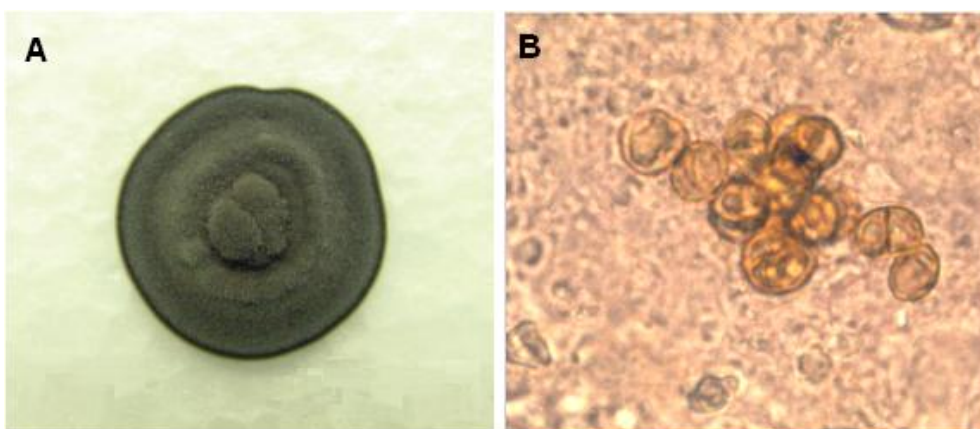
Ainda não se sabe por que a incidência é muito maior em homens do que em mulheres. Já foram realizados experimentos para tentar explicar a diferença da incidência de cromoblastomicose. Uma das explicações poderia vir da ação dos hormônios sexuais humanos no desenvolvimento do fungo durante a infecção. Hernández-Hernández *et al.* (1995) estudaram *in vitro* os efeitos de progesterona, testosterona e estradiol no crescimento de colônias de *P. verrucosa* – um dos agentes etiológicos da cromoblastomicose. Progesterona e testosterona exibiram efeito inibitório no crescimento do fungo, enquanto estradiol não impediu o crescimento. O mesmo grupo de pesquisadores descobriu em *P. verrucosa* a presença de ligantes no citoplasma que reconhecem especificamente progesterona – sugerindo um possível papel protetor do hormônio feminino contra a patogênese do fungo demáceo.

Tsuneto *et al.* (1989) realizaram um estudo comparando os sistemas antígeno leucocitário humano (HLA), ou complexos de histocompatibilidade (MHC) humano, de pacientes com cromoblastomicose com os de pessoas saudáveis. Eles verificaram que 28% dos 33 pacientes com cromoblastomicose portavam HLA-A29, contra apenas 4% dos 77 pacientes saudáveis. O resultado indicou que portadores de HLA-A29 seriam dez vezes mais propensos a desenvolver cromoblastomicose, caso fossem expostos a um agente etiológico da doença. Portanto, a susceptibilidade à cromoblastomicose pode estar associada ao HLA-A29 - gene localizado no cromossomo 6 humano, na região do MHC.

## 1.4 Diagnóstico

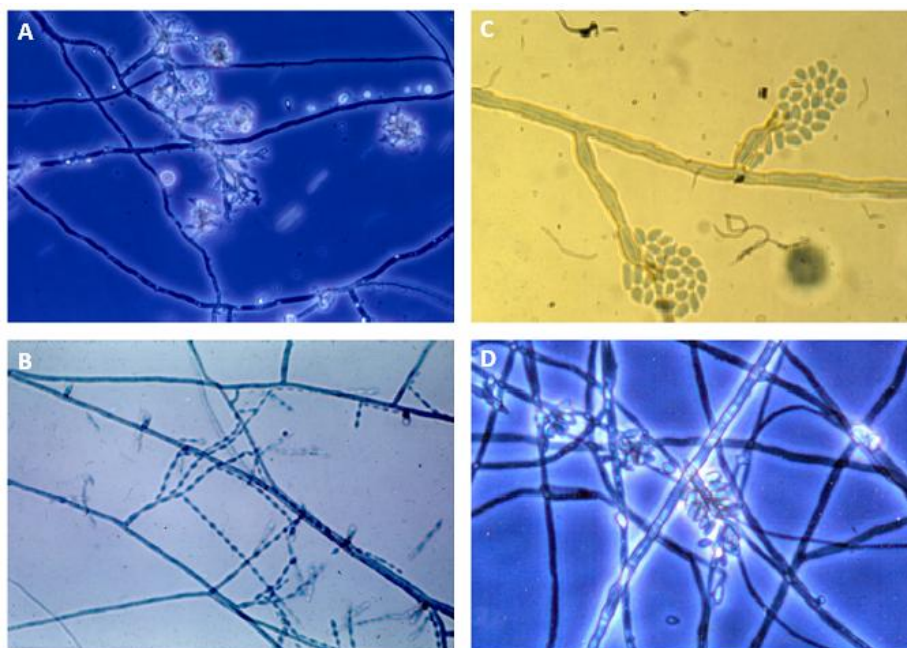
O diagnóstico de cromoblastomicose pode ser determinado a partir de exame direto e histológico da pele do paciente infectado (Kwon-Chung & Bennett, 1992). O exame consiste inicialmente na coleta do material a ser analisado por raspagem (esfregaço) ou biópsia da lesão do paciente supostamente infectado. Células infecciosas podem ser visualizadas ao microscópio por coloração com hematoxilina-eosina ou em solução de hidróxido de potássio 10%. As células infecciosas, também chamadas de células escleróticas, muriformes, fumagóides ou de Medlar, possuem forma esférica, com um ou dois septos, com parede celular espessa, e grande quantidade de melanina (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Brandt & Warnock, 2003; Gimenes *et al.*, 2005; Franzen *et al.*, 2006) (Figura 1).

O diagnóstico da cromoblastomicose por *F. pedrosoi* pode ser confirmado pelo isolamento e identificação do fungo após crescimento em cultura. Em meio ágar Sabouraud dextrose, colônias de *F. pedrosoi* após 14 dias de crescimento a 25°C possuem aspecto aveludado, de coloração verde escura inicialmente, seguida por marrom escura e finalmente preta (Figura 1). O microcultivo de *F. pedrosoi* em meio ágar batata também induz esporulação.



**Figura 1.** A) Cultura de *F. pedrosoi*; B) Fotomicrografia de células escleróticas em solução de hidróxido de potássio 10%, obtidas da raspagem direta da pele lesionada de paciente com cromoblastomicose (aumento de x1000). (Adaptados de A) Salgado *et al.*, 2004; B) Ameen, 2009).

As hifas, que constituem o micélio do fungo, são septadas; os conidióforos (estruturas que produzem os conídios) são eretos e se ramificam até os ápices das hifas. Os conídios são marrons e em forma de barril. Para diferenciar *F. pedrosoi* de outros fungos demáceos causadores da cromoblastomicose, deve-se analisar a conidiogênese do fungo (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Larone, 1995; Rippon *et al.*, 1988). A conidiogênese avalia a morfologia dos conídios e dos conidióforos e a disposição estrutural dos conídios nos conidióforos. *F. pedrosoi* apresenta hifas demáceas septadas, com três tipos de conidação: *Cladosporium*, *Phialophora* e *Rhinocladiella*. A do tipo *Cladosporium* é definida por conidióforos que formam cadeias de conídios que se ramificam por brotamento apical. Enquanto no gênero *Cladophialophora* os conídios do tipo *Cladosporium* são longos e ramificados, no gênero *Fonsecaea* os conídios são curtos e pouco ramificados (Figura 2A e 2B). A conidação do tipo *Phialophora* apresenta estruturas em forma de jarro, chamadas de fiálides vasiformes, dispostas ao longo das hifas que originam os conídios. Esses conídios se aglomeram na parte superior das fiálides (Figura 2C). E na conidação do tipo *Rhinocladiella*, os conídios unicelulares emergem opostos uns aos outros ao longo do conidióforo, em estruturas denticuladas chamadas de acroteca (Figura 2D).



**Figura 2.** A) Conidação tipo *cladosporium*, com conídios curtos, em *F. pedrosoi*; B) Conidação tipo *cladosporium*, com conídios longos, em *C. carrionii*; C) Conidação tipo *phialophora*, com filamentos septados e células fiálides em *P. verrucosa*; D) Conidação tipo *rhinocladiella* em *F. pedrosoi*; (azul de lactofenol; aumento de x1000 no microscópio) (Adaptado de Martínez *et al.*, 2007).

A observação por microscopia de dois dos três tipos de conidiação do microcultivo do fungo é o suficiente para diagnosticar diferencialmente *F. pedrosoi* dos demais fungos demáceos.

Técnicas de PCR (reação de polimerização em cadeia) e ELISA (ensaio imunoenzimático de adsorção) foram desenvolvidas para identificar fungos patogênicos, incluindo *Fonsecaea* e *C. carrionii*. Por PCR, um grupo de pesquisadores desenvolveu iniciadores (“primers”) específicos capazes de amplificar genes correspondentes às regiões espaçadoras intergênicas (ITS) dos genes de RNA ribossomal de *C. carrionii* (Abliz *et al.*, 2004). Andrade *et al.* (2007), usando PCR *duplex*, desenvolveram primers que amplificavam especificamente regiões intergênicas do DNA ribossomal de *Fonsecaea sp.* Além dos ensaios de PCR, foram desenvolvidos testes sorológicos pelo método de ELISA indireto para pacientes com cromoblastomicose causada por *C. carrionii* (Oberto-Perdigón *et al.*, 2005). Os pesquisadores utilizaram o antígeno somático de *C. carrionii* (AgSPP) para rastrear o soro dos pacientes. A sensibilidade e especificidade de AgSPP aos anticorpos dos pacientes infectados foram de 100% e 98,9%, respectivamente. Portanto, ELISA e PCR são ferramentas alternativas para auxiliar na identificação de isolados deste fungo. Esses testes oferecem diagnósticos rápidos e seguros do agente infeccioso, além de avaliarem o curso da doença e eficácia do tratamento aos pacientes. Também são importantes para determinarem a cura ou reincidência da doença. As desvantagens desses métodos são os custos elevados e a distribuição limitada, principalmente nas áreas rurais.

### **1.5 Curso clínico**

Clinicamente, a cromoblastomicose é caracterizada pelo desenvolvimento lento de lesões polimórficas na pele, frequentemente acompanhada inicialmente de pápulas eritematosas, que aumentam gradualmente de tamanho, apresentando morfologias variadas, como nódulos, verrugas, placas e tecido cicatricial (Figura 3). Em casos crônicos de cromoblastomicose, lesões podem ser tumorais e de aparência de couve-

flor (Richard-Blum *et al.*, 1998). Outras características incluem desenvolvimento de hiperplasia epitelial, fibrose e microabscessos na epiderme. Nos estágios avançados da infecção pode haver a disseminação de lesões satélites ao longo de vasos linfáticos ou por autoinoculação quando o paciente coça as lesões (Kondo *et al.*, 2005; Takase *et al.*, 1988). Também podem ocorrer infecções secundárias que levam ao desenvolvimento de linfodemas e elefantíase (Silva *et al.*, 1999; Kondo *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 1985).



**Figura 3.** Lesões polimórficas da cromoblastomicose. (A) Lesões com aspecto verrugoso; (B) Lesões com aspecto nodular; (C) e (D) Placas ulcerativas e ceratosas. (Adaptado de Martínez & Tovar, 2007; e Ameen, 2009).

Geralmente as lesões da cromoblastomicose são restritas ao tecido subcutâneo, mas em indivíduos imunossuprimidos pode haver a disseminação hematogênica extracutânea a linfonodos periféricos, pulmões e cérebro (Bonifaz *et al.*, 2001; Lupi *et al.*, 2005). Já foram relatados abscessos com *F. pedrosoi* no cérebro de indivíduos imunossuprimidos e imunocompetentes (McGinnis *et al.*, 1983; Al-Hedaithy *et al.*, 1988; Santosh *et al.*, 1995; Nobrega *et al.*, 2003; Saberi *et al.*, 2003).

## 1.6 Tratamento

O tratamento utilizado para a cromoblastomicose dependerá do estágio de desenvolvimento da doença (Esterre & Queiroz-Telles, 2006), sendo o grau e extensão

das lesões alguns dos fatores avaliados para determinar o estágio da doença. Em estágios iniciais, com lesões pequenas e isoladas o tratamento geralmente é eficaz, obtendo-se a cura. Em estágios crônicos, com lesões maiores e de aspecto verrugoso e/ou ulcerativo, a cromoblastomicose é tratada de maneira a diminuir a gravidade das lesões e/ou impedir que haja uma piora no quadro clínico do paciente. O tratamento atual geralmente é feito pela administração de um combinado de drogas antifúngicas, como itraconazol (200 a 400 mg/dia) e/ou terbinafina (250 a 500 mg/dia); anfotericina B (25mg/semanal) e 5-fluorocitosina; ou itraconazol e 5-fluorocitosina, por seis a doze meses (Bonifaz *et al.*, 1997; Gupta *et al.*, 2002; Poirriez *et al.*, 2000). Além do tratamento farmacológico, podem ser realizadas terapias físicas para a remoção das lesões. Lesões pequenas e isoladas podem ser retiradas por excisão cirúrgica. Crioterapia com nitrogênio líquido, termoterapia controlada e fotocoagulação com laser, com ou sem associação de fármacos antifúngicos, são outras opções de tratamento para cromoblastomicose (Bonifaz *et al.*, 1997; Castro *et al.*, 2003; Hira *et al.*, 2002).

Uma das dificuldades para tratar o paciente com lesões crônicas de cromoblastomicose é a duração do tratamento. Tratamentos demorados podem provocar tolerância e resistência do agente infeccioso ao fármaco administrado pelo paciente. Existem casos relatados de recidiva da cromoblastomicose em indivíduos durante longos tratamentos (Gimenes *et al.*, 2005; Esterre & Queiroz-Telles, 2006). Outra dificuldade do tratamento é a limitação da dose dos fármacos administrados. Doses altas podem ser hepatotóxicas, assim como podem destruir células de defesa do sistema imune do hospedeiro.

## **1.7 Imunologia**

A análise microscópica de secções histológicas de lesões crônicas de cromoblastomicose, tipo cistos, revela uma camada externa de tecido fibroso e uma camada interna de tecido inflamatório granulomatoso. O granuloma é constituído por células muriformes (escleróticas) do fungo circundadas por leucócitos



polimorfonucleares, neutrófilos, macrófagos e células gigantes multinucleadas, do tipo Langerhans (Kondo *et al.*, 2005; Brandt & Warnock, 2003). A formação do granuloma indica a tentativa das células efetoras do sistema imune em conter o crescimento e a disseminação do agente infeccioso no hospedeiro (Romani, 2004). Geralmente, um granuloma denso e definido aponta uma resposta imune protetora contra o fungo invasor. Um granuloma frouxo e menos definido indica uma resposta imune não protetora, que contribui para a evasão do fungo no hospedeiro, e conseqüentemente para o agravamento das lesões da cromoblastomicose. Estudos com camundongos atímicos infectados com *F. pedrosoi* reforçam a formação de granulomas difusos e confluentes, com distribuição dispersa do fungo (Ahrens *et al.*, 1989).

A primeira linha de defesa do hospedeiro contra a cromoblastomicose é representada por células do sistema imune inato, especialmente neutrófilos e macrófagos ativados, que visam à ingestão e eliminação do patógeno (Esterre *et al.*, 1993). Embora a internalização de células fúngicas pelas células fagocitárias seja frequente durante a infecção, a morte do agente invasor internalizado raramente é observada. Hayakawa *et al.* (2006) em experimentos *in vitro* revelaram que diferentes agentes etiológicos da cromoblastomicose, incluindo *F. pedrosoi*, quando fagocitados por macrófagos ativados, permaneciam vivos. Rozental *et al.* (1994) revelaram que macrófagos ativados atuam de forma predominantemente fungistática e não citotóxica contra *F. pedrosoi*, inibindo a formação de hifas e de tubos germinativos.

Além de promoverem a fagocitose dos patógenos, as células fagocíticas podem atuar como células apresentadoras de antígeno aos linfócitos T, estimulando a produção de citocinas próinflamatórias, como interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Teixeira de Sousa *et al.*, 2006). Entretanto, células de *F. pedrosoi* ao serem fagocitadas por macrófagos provocam a inibição da expressão de moléculas MHC-II e CD80 nos macrófagos, diminuindo, portanto, a modulação de linfócitos T contra a cromoblastomicose (Hayakawa *et al.*, 2006).

A imunidade adaptativa contra a cromoblastomicose abrange as respostas humoral e celular. Pacientes infectados com a doença produzem anticorpos específicos (IgG1, IgM e IgA) contra o fungo (Esterre *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2004). No entanto,

assim como em outras doenças crônicas causadas por infecções fúngicas, a resposta imune humoral (Th2) parece não desempenhar papel protetor quando comparada com a imunidade mediada por células (Th1) (Queiroz-Telles *et al.*, 2009).

Fuchs e Pecher (1992) sugerem que, em pacientes com longo histórico de cromoblastomicose, a imunidade mediada por células está de alguma maneira interrompida, e por isso, estes indivíduos seriam incapazes de desenvolver uma resposta imune eficiente, contribuindo para sua persistência do fungo no hospedeiro. De fato, em pacientes com formas severas de cromoblastomicose, ocorre uma alta produção de IL-10 e baixos níveis de IFN- $\gamma$ , associado a uma imunidade adquirida predominantemente do tipo humoral (Gimenes *et al.*, 2005). Além disso, os linfócitos T destes indivíduos são incapazes de proliferar *in vitro* mesmo após indução por cromAg (correspondente ao sobrenadante de cultura livre de células, após cultivo de *F. pedrosoi* em meio Sabouraud). Já em pacientes com as formas brandas da doença, os linfócitos T são eficientes na proliferação, e há alta produção de IFN- $\gamma$  e baixos níveis de IL-10. Esses resultados sugerem que a indução de uma resposta imune protetora contra a cromoblastomicose depende da proliferação de linfócitos T que secretem altos níveis de IFN- $\gamma$  (Gimenes *et al.*, 2005; Teixeira de Sousa *et al.*, 2006).

Sousa *et al.* (2011) demonstraram em modelo murino que a cronicidade da cromoblastomicose causada por *F. pedrosoi* desenvolve-se pela falta de coestimulação aos receptores de reconhecimento padrão (PRR). No modelo testado, *F. pedrosoi* era inicialmente reconhecido por receptores de lectina do tipo C (CLRs), e não por receptores do tipo Toll (TLRs), o que resultava na indução deficiente de citocinas pró-inflamatórias. As respostas inflamatórias a *F. pedrosoi* eram restauradas após coestimulação dos TLRs, mas também requeriam o reconhecimento por CLRs (Mincle) e a sinalização via Syk/CARD9. Os pesquisadores verificaram que a administração exógena de ligantes de TLRs (LPS para TLR4 e imiquimode para TLR7) auxiliou na eliminação de *F. pedrosoi* durante infecção *in vivo*. Os resultados sugerem que a cronicidade de cromoblastomicose é provocada pela falha no reconhecimento inato, destacando, portanto, a importância de uma sinalização coordenada de PRR no reconhecimento ao agente invasor. Além disso, a aplicação tópica direta de imiquimode (agonista de PRR) em lesões de camundongos reduziu significativamente a

carga fúngica nos tecidos infectados, inclusive subcutâneo. Os pesquisadores sugerem que a abordagem terapêutica de agonistas de PRR, ainda que necessite de otimizações, pode funcionar em humanos infectados por cromoblastomicose, já que macrófagos humanos sem estímulos artificiais à TLR também foram incapazes de induzir respostas inflamatórias eficientes contra *F. pedrosoi*.

Uma das hipóteses para explicar a falha no reconhecimento de *F. pedrosoi* pelos PRR seria a de que componentes imunoestimulatórios da parede celular do fungo estariam de alguma maneira mascarados. Entretanto, o rompimento de parede celular e subsequente exposição de PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) em organismos mortos pelo calor não induziram respostas protetoras contra a cromoblastomicose (Robinson *et al.*, 2009). Isso sugere que a falha no reconhecimento por *F. pedrosoi* deve-se a níveis insuficientes de ligantes à TLR para indução das respostas proinflamatórias (Sousa *et al.*, 2011). A natureza química destes ligantes de *F. pedrosoi* ainda é desconhecida.

### **1.8 Diferenciação celular de *F. pedrosoi***

O ciclo de vida de *F. pedrosoi* abrange diferentes estágios morfológicos que incluem estruturas reprodutivas (conídios), saprofíticas (micélio) e parasitárias (corpos escleróticos). A transição morfológica ocorre entre todas as formas, exceto pela transição de células escleróticas a conídios (Lopez Martinez & Mendez-Tovar, 2007). Estudos *in vivo* sobre os fatores que desencadeiam o processo de transição dimórfica de *F. pedrosoi*, especialmente durante a infecção ao hospedeiro na cromoblastomicose, ainda são incipientes. Entretanto, experimentos *in vitro* revelaram que o processo de transição dimórfica é ativado por múltiplos fatores, como: temperatura, nutrientes e condições aeróbicas (Szaniszlo *et al.*, 1983; Osheroov & May, 2001; van Burik & Magee, 2001).

*F. pedrosoi* cresce preferencialmente na forma de hifas quando cultivado sob condições sem agitação. Enquanto o cultivo sob agitação por curtos períodos, 2 a 5 dias, estimula a formação de conídios (Santos *et al.*, 2007).

O crescimento de *F. pedrosoi* em meio ácido suplementado com propanolol (800 mM) a 37°C por 14 dias induz a formação de corpos escleróticos (Alviano *et al.*, 1992). Silva *et al.* (2002) verificaram que os corpos escleróticos formados nessas condições eram morfológica e antigenicamente similares a corpos escleróticos obtidos *in vivo*. Concentrações baixas de Ca<sup>2+</sup> (0,1 mM) e pH 2,5 também induzem a transição de micélio a corpos escleróticos em *F. pedrosoi* (Mendoza *et al.*, 1993).

Alviano *et al.* (2003) descobriram que o tratamento de células miceliais com o fator de ativação plaquetária (PAF) resultou na formação de corpos escleróticos similares a corpos escleróticos induzidos por propanolol. O fator de ativação plaquetária é um potente mediador inflamatório fosfolipídico de diversas funções, que incluem agregação plaquetária, inflamação e anafilaxia. O PAF é produzido por macrófagos, leucócitos polimorfonucleares, plaquetas e células endoteliais. Já foi descrito como indutor da diferenciação de vários tipos celulares, animais e microbrianos (Chao & Olson, 1993; Rodrigues *et al.*, 1996; Lopes *et al.*, 1997). Como o PAF é sintetizado em condições normais pelo hospedeiro humano, os pesquisadores sugerem que o PAF possa ser um potencial indutor *in vivo* da diferenciação de *F. pedrosoi* a corpos escleróticos.

As células escleróticas são extremamente resistentes à ação efetora de células do sistema imune do hospedeiro humano durante a infecção por cromoblastomicose (Esterre *et al.*, 1993; Hamza *et al.*, 2003). O entendimento dos processos de diferenciação celular torna-se interessante para o desenvolvimento de drogas antifúngicas que permitam o controle da infecção por cromoblastomicose, ao impedir a transformação de micélios a corpos escleróticos de *F. pedrosoi*.

## 1.9 Virulência de *F. pedrosoi*

Os mecanismos que conferem proteção à *F. pedrosoi* na infecção ainda são pouco esclarecidos. Mas acredita-se que a patogênese de *F. pedrosoi* envolve a participação de diversos componentes do fungo. Moléculas de parede celular e enzimas secretadas contribuem para a virulência do fungo no estabelecimento da cromoblastomicose.

A infecção de *F. pedrosoi* inicia-se pela inoculação traumática transcutânea de conídios e fragmentos de hifa do fungo no hospedeiro. A infecção é procedida pela interação de células do fungo com células epiteliais e fagocíticas do hospedeiro. O contato entre as células é mediado pelo reconhecimento de adesinas do tipo lectina do fungo por receptores específicos das células efetoras do sistema imune (Limongi *et al.*, 1997). Geralmente, a adesão de *F. pedrosoi* é acompanhada pela internalização do fungo por células fagocíticas que visam à eliminação do agente invasor (Farbiaz *et al.*, 1990; Limongi *et al.*, 1997). Entretanto, *F. pedrosoi* e outros patógenos intracelulares são capazes de se evadir das respostas imunes do hospedeiro (Verstrepen & Klis, 2006).

A sobrevivência de *F. pedrosoi* durante a infecção ao hospedeiro parece estar relacionada à capacidade de síntese de melanina pelo fungo. Cunha *et al.* (2010) revelaram *in vitro* que a melanização de células fúngicas promove proteção contra o ataque oxidativo de espécies reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio e óxido nítrico) produzido por macrófagos. Estudos de interação *in vitro* entre macrófagos e células de *F. pedrosoi* revelaram inibição da liberação de NO (óxido nítrico) por macrófagos (Hayakawa *et al.*, 2006; Bocca *et al.*, 2006). Farbiaz *et al.* (1992) relataram que a melanina de *F. pedrosoi* também inibe a fagocitose mediada por macrófagos, atuando provavelmente como uma barreira física, mascarando outros componentes da parede celular do fungo, como manana e  $\beta$ -glucana, dos receptores de macrófagos. Resultados similares foram encontrados em estudos de infecção *in vitro* com melanina de *P. brasiliensis* e *C. neoformans* na interação com macrófagos murinos (Silva *et al.*, 2006; Mednick *et al.*, 2005). Melanina também parece interferir na ativação de complemento, reduzindo a suscetibilidade a agentes antifúngicos (Nosanchuk &

Casadevall, 2003). Assim, a melanina consistiria em um mecanismo importante de evasão do fungo ao sistema imune do hospedeiro.

*F. pedrosoi* produz melanina associada a ácidos graxos, polissacarídeos e proteínas de parede celular. Os constituintes de açúcar eram manose, ramanose, galactose e glicose, enquanto que os componentes lipídicos, mais numerosos, incluíam ácidos graxos saturados e insaturados de C16 a C18. Os principais aminoácidos eram ácidos aspártico e glutâmico, leucina, glicina e alanina (Alviano *et al.*, 1991).

Partículas isoladas de melanina também podem ser secretadas no meio de cultura por *F. pedrosoi*. Alviano *et al.* (2004a) observaram que a melanina extracelular é reconhecida por anticorpos de pacientes com cromoblastomicose. Conídios de *F. pedrosoi*, quando tratados com triciclazol, inibidor de melanina, eram mais suscetíveis aos efeitos antimicrobianos de macrófagos (Cunha *et al.*, 2005).

Mesmo na ausência de células efetoras do hospedeiro, anticorpos contra melanina inibiam *in vitro* o crescimento e a viabilidade de células conidiais; apenas 2,8% dos conídios permaneciam viáveis, indicando toxicidade mediada por anticorpos. Nos corpos escleróticos a inibição de crescimento era menor, o que poderia ser explicado pela formação típica de largos agregados (Alviano *et al.*, 1992) que impediriam o acesso de ligantes externos dos anticorpos às células internas do agregado.

A fosforilação e desfosforilação de proteínas desempenham papel central na resposta a patógenos invasores por células efetoras do hospedeiro (Mendes-Giannini *et al.*, 2005). Em *F. pedrosoi*, tem sido sugerido que a adesão e a invasão a células epiteliais dependem da ação de proteínas quinases (Limongi *et al.*, 2003). O pré-tratamento de conídios de *F. pedrosoi* com inibidores de proteínas quinases (estaurosporina, genisteína e calfofina) antes da infecção diminuiu significativamente a invasão celular por *F. pedrosoi* a células epiteliais, mas não a macrófagos. Os pesquisadores sugerem que o maquinário associado à proteína quinase do fungo não é necessário para a entrada em células fagocíticas. Mas seria requerido na invasão a células não fagocíticas, o que sugere um processo ativo na invasão de *F. pedrosoi*.

Os ácidos siálicos constituem uma família de monossacarídeos que incluem derivados metabólicos de ácido neuramínico (Schauer, 1982). Estudos na identificação de componentes de parede celular de conídios e micélios de *F. pedrosoi* revelaram a presença de ácidos siálicos, como N-acetilneuramínico (Neu5Ac) e N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) (Souza *et al.*, 1986; Alviano *et al.*, 2004b). Em contraste, ácidos siálicos e glicoproteínas sialiladas não foram detectados em células escleróticas de *F. pedrosoi* obtidas *in vitro* e em *in vivo*, embora os autores não descartem a idéia de que a técnica utilizada na detecção dos ácidos siálicos possa ser deficiente para o estudo de corpos escleróticos (Alviano *et al.*, 2004b).

A remoção enzimática de ácidos siálicos da superfície de conídios de *F. pedrosoi* resultou no aumento da fagocitose por neutrófilos humanos (Alviano *et al.*, 2004b). Os pesquisadores sugerem que o papel dos conjugados de ácido siálico durante a infecção por *F. pedrosoi* seja similar ao proposto em outras infecções (Rodrigues *et al.*, 1997), em que a expressão de ácidos siálicos por propágulos infecciosos protegeria o fungo contra a ação efetora de células hospedeiras até a completa diferenciação à forma parasítica. Os corpos escleróticos não necessitariam da produção de ácidos siálicos, pois neles o aumento na expressão de melanina protegeria o fungo das ações efetoras das células do hospedeiro após a fagocitose.

Em *F. pedrosoi*, ectofosfatases foram caracterizadas como enzimas da parede celular do fungo (Kneipp *et al.*, 2003, 2004). A atividade de ectofosfatases em *F. pedrosoi* parece estar associada ao parasitismo, já que células escleróticas demonstraram atividade de ectofosfatases muito maiores que em conídios e micélios do fungo (Kneipp *et al.*, 2003). O pré-tratamento de conídios de *F. pedrosoi* com ortovanadato, um inibidor irreversível de ecto-fosfatases ácida, reduziu a capacidade de adesão dos conídios às células epiteliais murinas (Kneipp *et al.*, 2004). O resultado sugere que ectofosfatases contribuem na etapa de adesão de conídios de *F. pedrosoi* às células hospedeiras. O mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que essas ectofosfatases são ativadas por  $Zn^{2+}$ .

Palmeira *et al.* (2006a) identificaram em conídios de *F. pedrosoi*, cultivados em meios quimicamente definidos e complexos, a produção de peptidases extracelulares, do tipo aspartil. O tratamento de pepstatina A, inibidor de peptidases, em conídios de *F. pedrosoi* demonstrou atividade fungicida, inibindo o crescimento e a transformação de conídios em células miceliais. Além disso, inibidores de aspartil peptidases reduziram significativamente os índices de adesão e endocitose de conídios durante a interação com células epiteliais, fibroblastos e macrófagos. Os resultados ressaltam, assim, a dependência de peptidases tipo aspartil do fungo durante a interação patógeno/hospedeiro (Palmeira, 2006; Palmeira *et al.*, 2006b).

Atualmente, os estudos de genética molecular de *F. pedrosoi* são incipientes. Até o momento, o genoma de *F. pedrosoi* não foi estabelecido, sendo poucos os genes do fungo descritos na literatura. Foram apenas identificados genes que codificam Cdc42p (envolvida na regulação do ciclo celular), actina,  $\beta$ -tubulina, citocromo b e rRNA.

Quais são os genes relacionados aos processos morfogênicos do fungo? Como as células escleróticas são capazes de resistir ao combate das células efetoras na defesa do hospedeiro? Quais fatores de virulência de *F. pedrosoi* são indispensáveis para a sua sobrevivência e desenvolvimento no hospedeiro durante a cromoblastomicose? A caracterização do transcritoma de *F. pedrosoi* revelará possíveis candidatos.



## 2. JUSTIFICATIVA

A falta de informações quanto à genética molecular de *F. pedrosoi*, evidenciada pela quantidade pequena de genes do fungo descritos na literatura, serviu de estímulo para a identificação de transcritos do fungo no presente trabalho. O objetivo central do trabalho foi iniciar a caracterização do transcrito de *F. pedrosoi* a partir da geração de um banco de ESTs do fungo empregando a construção de uma biblioteca de cDNA de *F. pedrosoi* e sequenciamento das sequências obtidas. A identificação dos transcritos de *F. pedrosoi* é deduzida a partir de análises de similaridade com genes descritos em outros organismos cujas sequências foram depositadas nos bancos de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

A caracterização da biblioteca de cDNA de *F. pedrosoi* revelará genes relevantes do fungo, especialmente fatores de virulência, que codificam proteínas envolvidas na síntese de moléculas de superfície de parede celular ou de moléculas secretadas, como adesinas, melanina, peptidases, fosfatases e glicosíngolipídios, indispensáveis para a disseminação do fungo dentro do hospedeiro. A identificação de genes que codificam potenciais antígenos imunodominantes de *F. pedrosoi*, servirá para o melhor conhecimento da biologia molecular deste patógeno humano, além de contribuir para a epidemiologia e diagnóstico da cromoblastomicose.

A construção da biblioteca de *F. pedrosoi* deste trabalho foi realizada a partir do cultivo do fungo nas mesmas condições de cultivo do fungo descritas no trabalho (não publicado) do grupo do Dr. Sandro Almeida (USP-SP) e da Dra. Karen S. Ferreira (UNIFESP – Campus de Diadema). O grupo identificou no sobrenadante de cultivo (meio Sabouraud líquido) de diferentes isolados de *F. pedrosoi* a presença de uma proteína de 30 kDa, que apresentou imunorreação específica apenas a soros de pacientes com cromoblastomicose; não houve reação cruzada contra soros de pacientes com outras infecções fúngicas como a histoplasmose, aspergilose, esporotricose e paracoccidioidomicose. Assim, o meio Sabouraud líquido foi escolhido como meio de cultivo na construção da biblioteca de cDNA de *F. pedrosoi* visando à identificação do gene que codifica a proteína imunogênica de 30 kDa, além da busca por genes que codificam outros potenciais fatores de virulência do fungo.

Adicionalmente, em colaboração com o grupo acima citado, estamos engajados em um projeto futuro visando à clonagem e caracterização do cDNA relativo a esta proteína secretada em altos níveis por *F. pedrosoi* – até o momento a sequência da proteína de 30 kDa não foi determinada. Futuramente, o grupo pretende, após a identificação do cDNA correspondente à proteína de 30 KDa, expressá-la em sistema heterólogo, o qual poderá auxiliar em estudos de vacina, diagnóstico molecular, epidemiologia e mecanismos de patogênese na cromoblastomicose.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

- Geração de um banco de ESTs de *F. pedrosoi*, visando à caracterização do primeiro transcrito parcial deste patógeno humano.

#### **3.2 Específicos**

- Construção de uma biblioteca de cDNA de *F. pedrosoi*;
- Sequenciamento de clones de cDNA da biblioteca;
- Análise das sequências de cDNA por ferramentas de bioinformática.

## 4. MATERIAL

### 4.1 Meios de cultura para *F. pedrosoi*

Todos os meios utilizados para o cultivo de *F. pedrosoi* foram preparados com água destilada, e esterilizados em autoclave a 120°C por 15 min.

#### Meio Sabouraud dextrose ágar

Peptona bacteriológica	5,0 g/L
Hidrolizado enzimático de caseína	5,0 g/L
Dextrose	40,0 g/L
Ágar	15,0 g/L

#### Meio Sabouraud líquido

Peptona bacteriológica	5,0 g/L
Hidrolizado enzimático de caseína	5,0 g/L
Dextrose	20,0 g/L

### 4.2 Meios de cultura para *E. coli*

#### Meio Luria-Bertani (LB)

Peptona de caseína	10,0 g/L
Extrato de levedura	5,0 g/L
Extrato de levedura	5,0 g/L
NaCl	10,0 g/L
pH ajustado para 7,2	

#### Meio LB ágar

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a 1,4% (p/v).

**Meio SOB**

Bacto-triptona	20,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
NaCl	0,6 g
KCl	0,5 g
H <sub>2</sub> O	q.s.p 1000 mL
pH ajustado para 7,2	

**Meio SOC**

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

As soluções de glicose, MgCl<sub>2</sub> e MgSO<sub>4</sub> foram esterilizadas por filtração em membrana millipore de 0,22 µm.

**4.3 Meios e soluções para a extração de DNA plasmidial (mini-preparação)****Meio 2XYT**

Peptona de caseína	1,6 % (p/v)
Extrato de levedura	1,0 % (p/v)
NaCl	0,5 % (p/v)
pH ajustado para 7,2	

### **Solução I (GET)**

Glicose 20% (filtrada ou autoclavada)	23,0 mL
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	10,0 mL
Tris-HCl 1,0 M (pH 8,0)	13,0 mL
H <sub>2</sub> O milli-Q	q.s.p 500 mL

### **Solução II (Solução de Lise alcalina)**

NaOH	0,2 M
SDS	1,0 %

Preparada somente no momento de uso.

### **Solução III (Solução de Neutralização)**

Acetato de potássio 5 M	60,0 mL
Ácido acético glacial	11,5 mL
H <sub>2</sub> O q.s.p 100 mL	

### **Solução estoque de RNase A**

<b>RNase A</b>	<b>20 mg/mL</b>
----------------	-----------------

Foi dissolvida em tampão acetato de sódio 50 mM; pH 4,8 e fervida em banho-maria por 20 min para eliminação de qualquer DNase contaminante. As alíquotas foram preparadas em tubos tipo eppendorf de 1,5 mL e estocadas em freezer a -20°C.

## **4.4 Antibiótico**

### **Ampicilina:**

- Solução estoque: 10 mg/mL em água destilada estéril
- Concentração final de uso: 100 µg/mL

A completa solubilização de ampicilina foi realizada a partir da adição de pequenas gotas de solução de NaOH 0,5 M. A solução de ampicilina foi esterilizada por

filtração em membrana millipore de 0,22  $\mu\text{m}$ , e estocada em ambiente protegido da luz, a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.5 Soluções para eletroforese em géis de agarose

##### **Tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 50X**

Tris-base	242 g
EDTA 0,5 M	100 mL
Ácido acético	57,1 mL
H <sub>2</sub> O	q.s.p 1000 mL

pH ajustado para 8,5

##### **Tampão de Amostra (5X) para análise de DNA por eletroforese**

TEB 10X	25 % (p/v)
Glicerol	50 % (p/v)
Azul de bromofenol	0,25 % (p/v)
Xilenocianol	0,25 % (p/v)

##### **Solução de Brometo de etídio**

Solução estoque: 10 mg/mL em água destilada

Concentração final de uso: 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$

#### 4.6 Enzimas

Taq DNA polimerase (5unidades/ $\mu\text{L}$ ) (Ludwig Biotec)

SuperScript™II RT (200 unidades/ $\mu\text{L}$ ) (Invitrogen)

*E. coli* DNA ligase (10 unidades / $\mu\text{L}$ ) (Invitrogen)

*E. coli* DNA polimerase I (10 unidades / $\mu\text{L}$ ) (Invitrogen)

*E. coli* RNase H (2 unidades / $\mu\text{L}$ ) (Invitrogen)

T4 DNA polimerase (5 unidades / $\mu\text{L}$ ) (Invitrogen)

T4 DNA ligase (1 unidades / $\mu\text{L}$ ) (Invitrogen)

*Not I* (15 unidades / $\mu\text{L}$ ) (Invitrogen)

#### 4.7 Tampões de enzimas

##### **Tampão da Taq DNA Polimerase 10X**

Tris-HCl pH 8,5	100 mM
KCl	500 mM

##### **Tampão 5X de síntese da primeira fita**

Tris-HCl (pH 8.3)	250 mM
KCl	375 mM
MgCl <sub>2</sub>	15 mM

##### **Tampão 5X de síntese da segunda fita**

Tris-HCl (pH 6.9)	100 mM
KCl	450 mM
MgCl <sub>2</sub>	23 mM
β-NAD <sup>+</sup>	0,75 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50 mM

##### **Tampão 5X T4 DNA ligase**

Tris-HCl (pH 7.6)	250 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM
ATP	5 mM
DTT	5 mM
PEG 8000	25% (w/v)

##### **Tampão REact® 3**

Tris-HCl (pH 8.0)	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
NaCl	100 mM

#### 4.8 Marcador de massa molecular (MM)

1 kb DNA ladder plus (Invitrogen).



#### 4.9 Oligonucleotídios sintéticos

Para o sequenciamento de cDNA foram utilizados os oligonucleotídios sintéticos

M13 Universal e M13 Reverso, confeccionados pela DNAgency (CA, USA):

M13 Universal: GTAAAACGACGGCCAGT

M13 Reverso: AACAGCTATGACCATG

Adaptadores para as extremidades dos fragmentos de cDNA da biblioteca:

Adaptador Sal I (1 µg/µL) (Invitrogen);

Adaptador Not I (0.5 µg/µL) (Invitrogen).

#### 4.10 Microorganismo utilizado

##### **Linhagem *F. pedrosoi* (ATCC 46428):**

O fungo foi gentilmente cedido pelo grupo da Dra. Anamélia Bocca, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

##### **Linhagem *E. coli* ElectroMax DH10B (Invitrogen):**

- Genótipo: F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *endA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara, leu*)7697 *galU* *galK*  $\lambda$ - *rpsL* *nupG*.

As células *E. coli* ElectroMAX DH10B podem ser transformadas somente por eletroporação (Calvin & Hanawalt, 1988). As células DH10B são desejáveis para a construção de bancos de genes ou para a geração de bibliotecas de cDNA usando vetores derivados de plasmídeos. O marcador  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15 fornece  $\alpha$ -complementação do gene  $\beta$ -galactosidase, permitindo a seleção azul/branco dos clones crescidos em meio ágar contendo X-gal.

#### 4.11 Plasmídeo utilizado

**Plasmídeo pSPORT 1, digerido por *Not I* e *Sal I* (50 ng/μL) (Invitrogen):**

O pSPORT 1 foi o vetor utilizado para a construção da biblioteca de cDNA de *F. pedrosoi*, provido pelo kit “SuperScript™ Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning” (Invitrogen, EUA). O vetor de 4,1 kb possui marca de seleção para ampicilina (APr) e pode ser usado para a expressão de genes clonados a partir da indução de seu promotor lac (lacP). O pSPORT 1 contém a seqüência lacOPZ' para seleção azul/branco dos clones. Isso permite a seleção de clones recombinantes contendo inserto de cDNA clonado no vetor plasmidial.

#### 4.12 Kits utilizados

- “Dynabeads® Oligo (dT)<sub>25</sub>” (Invitrogen);
- “SuperScript™ Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning” (Invitrogen);
- “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystems).

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

#### 4.13 Ferramentas de bioinformática

- Filtragem de vetor pela ferramenta Vecscreen:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>
- Análise de eletroferogramas via Phred, pelo *pipeline* PHPH (Megabace ou ABI):  
<http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>
- Busca de sequências nos bancos de dados do NCBI:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Análise de sequências pela ferramenta Blastx:  
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

- Classificação funcional das sequências pela ferramenta KEEG *Orthology*:

<http://www.genome.jp/tools/blast/>

- Tradução de nucleotídeos pela ferramenta *translate* do ExPASy:

<http://web.expasy.org/translate/>

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Cultivo do fungo *F. pedrosoi*

Foi utilizada a cepa 46428 da “American Type Culture Collection” (ATCC) de *F. pedrosoi*. O fungo foi cultivado em placas de Petri em meio ágar Sabouraud dextrose. As placas com o fungo foram mantidas em estufa a 30°C por 21 dias, e posteriormente conservadas na geladeira. Após o crescimento em meio sólido, o fungo foi repicado em meio Sabouraud líquido, em frascos sob agitação a 160 rpm a 30°C por 14 dias. Após o crescimento em meio líquido, o fungo foi recuperado por filtração em papel de filtro Whatmann nº 01. Em seguida, o fungo foi congelado em nitrogênio líquido, e guardado imediatamente em freezer a -80°C para posterior extração de RNA total.

### 5.2 Extração de RNA total de *F. pedrosoi*

Para a extração de RNA total de *F. pedrosoi* foi utilizado o reagente TRIZOL<sup>®</sup> (Invitrogen). Além do TRIZOL, todos os materiais usados eram livres de RNase, empregando-se os cuidados descritos por Sambrook e Russel (2001) para garantir a integridade do RNA extraído. Antes da adição de TRIZOL, o micélio recuperado por filtração foi pesado (peso úmido) para definirmos o volume necessário de TRIZOL para lise das células do fungo. Após a pesagem (2 g), o fungo foi macerado com nitrogênio líquido até se tornar um pó. Ao macerado do fungo (pó) foi adicionado TRIZOL (20 mL), além de pérolas de vidro de 5 mm de diâmetro para favorecer a lise do fungo durante a etapa de homogeneização. Seguimos as etapas definidas pelo protocolo do TRIZOL, incluindo a etapa opcional de centrifugação para a retirada de restos celulares sedimentados.

Após a extração do RNA total do fungo, este foi quantificado. Utilizamos o Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) para avaliar a quantidade e qualidade de RNA total extraído. A integridade do RNA total de *F. pedrosoi* foi determinada pela visualização das bandas de rRNA 18S e 26S após eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (0,5µg/mL).

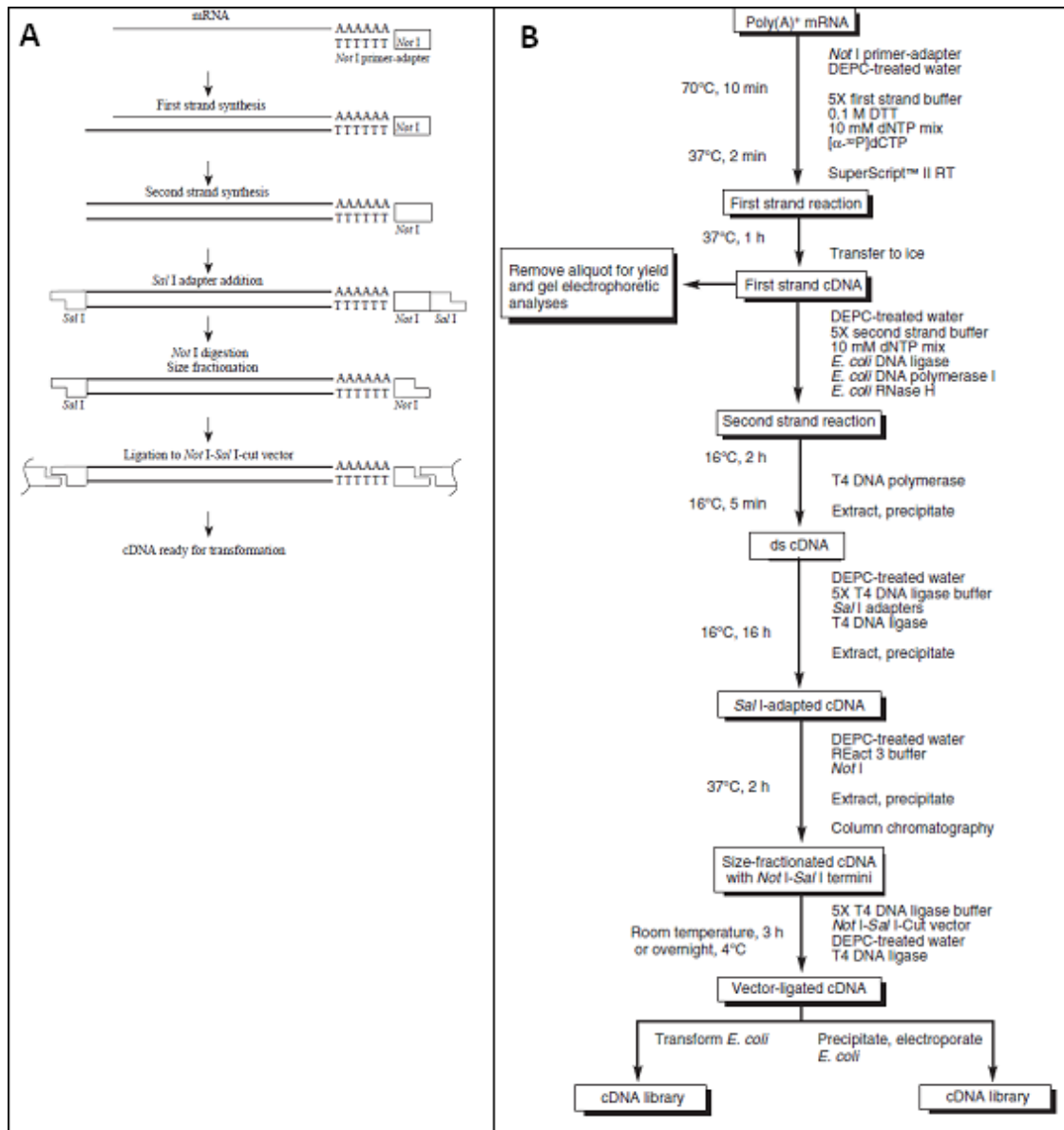
### 5.3 Purificação de RNA poli A<sup>+</sup> de *F. pedrosoi*

Após a extração de RNA total utilizando o reagente Trizol, a fração de mRNA poli (A)<sup>+</sup> foi purificada com o kit “Dynabeads<sup>®</sup> Oligo (dT)<sub>25</sub>” (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante.

As frações de mRNA poli (A)<sup>+</sup> isoladas foram quantificadas por espectrofotometria empregando o Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Os mRNA poli (A)<sup>+</sup>, obtidos de diferentes isolamentos com Dynabeads<sup>®</sup> Oligo (dT)<sub>25</sub>, foram reunidos em um único tubo para serem concentrados por liofilização (Liofilizador L101 LIOTOP). Depois de liofilizados, o mRNA seco foi ressuspensionado em água milli-Q (livre de RNase) e quantificado como descrito acima. Esta preparação de mRNA (1,9 µg em 8µL de água) foi empregada como material de partida para a construção da biblioteca de cDNA de *F. pedrosoi*.

### 5.4 Construção da biblioteca de cDNA de *F. pedrosoi*

Para a construção da biblioteca de cDNA de *F. pedrosoi*, utilizamos o kit “SuperScript<sup>™</sup> Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning” (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante, com modificações. Não foi empregado material radioativo para estimativa do rendimento da síntese de cDNA. A quantificação de cDNA foi feita pelo equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Os passos de precipitação com acetato de amônio e álcool foram substituídos pelo uso da coluna YM-30 Microcon (Amicon) conforme instruções do fabricante. Os cDNA foram concentrados e lavados na coluna por meio de centrifugações. As principais etapas da construção da biblioteca estão descritas na Figura 4 (A e B). A figura 4A evidencia a obtenção de fragmentos de cDNA com extremidades digeridas pelas enzimas *Not* I e *Sal* I. A Figura 4B detalha os passos do protocolo, definindo tempo, temperatura e os componentes de cada reação.



**Figura 4.** A) Sumário do procedimento do kit “SuperScript™ Plasmid System” e B) Fluxograma detalhado do protocolo “SuperScript™ Plasmid System”.

#### 5.4.1 Síntese da primeira fita de cDNA

O sistema de reação para a síntese da primeira fita de cDNA, de volume final de 20  $\mu\text{L}$ , foi constituído de: 8  $\mu\text{L}$  de mRNA (1,9  $\mu\text{g}$ ); 2  $\mu\text{L}$  de *Not I primer adapter* (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); 2  $\mu\text{L}$  SuperScript™ II RT (20 a 100 U; 10.000 a 50.000 unidades/mL); 4  $\mu\text{L}$  de tampão 5X de síntese da primeira fita (50 mM Tris-HCl pH 8.3; 75 mM KCl; 3 mM  $\text{MgCl}_2$ ); 2  $\mu\text{L}$  DTT 0,1 M (10 mM DTT); 1  $\mu\text{L}$  dNTP Mix 10 mM (500  $\mu\text{M}$  de cada dNTP) e 1  $\mu\text{L}$  de água milli-Q (livre de RNase).

A reação de síntese da primeira fita de cDNA ocorreu a partir da hibridização do iniciador de oligo dT, contendo o sítio de restrição de *Not I* em sua extremidade 5' (*Not I primer adapter*) à cauda poli A das moléculas de mRNA. A partir desse híbrido, a enzima SuperScript™ II RT pode iniciar, a 37°C por 2h, a síntese da primeira fita de cDNA.

#### 5.4.2 Síntese da segunda fita de cDNA

Após a síntese da primeira fita, foram adicionados aos 20  $\mu\text{L}$  do sistema de reação os seguintes componentes para a síntese da segunda fita de cDNA: 91  $\mu\text{L}$  de água milli-Q; 30  $\mu\text{L}$  de tampão 5X de síntese da segunda fita; 3  $\mu\text{L}$  dNTP Mix (250  $\mu\text{M}$  de cada nucleotídeo); 1  $\mu\text{L}$  *E. coli* DNA Ligase (10 unidades/ $\mu\text{L}$ ); 4  $\mu\text{L}$  *E. coli* DNA Polimerase I (10 unidades/ $\mu\text{L}$ ) e 1  $\mu\text{L}$  *E. coli* RNase H (2 unidades/ $\mu\text{L}$ ), totalizando 150  $\mu\text{L}$ .

A síntese da segunda fita de cDNA foi catalisada pela enzima de *E. coli* DNA polimerase I combinada com as enzimas de *E. coli* RNase H e DNA ligase. Após a formação de cDNA dupla-fita, adicionou-se a enzima T4 DNA polimerase que tornou coesivas as extremidades dos cDNA. Dos 150  $\mu\text{L}$  de cDNA fita dupla, aliquotamos 12  $\mu\text{L}$  para serem analisados por eletroforese em gel de agarose. O restante da amostra de cDNA fita dupla foi concentrado empregando-se a coluna Microcon YM-30 (Amicon), como recomendado pelo fabricante.

### 5.4.3 Adição de adaptadores *Sal* I

Para a ligação de adaptadores *Sal* I, foram adicionados à amostra de cDNA fita dupla obtida na etapa anterior (25 µL) os seguintes reagentes, em uma reação de volume final de 50 µL: 10 µL de tampão 5X T4 DNA Ligase; 10 µL adaptadores *Sal* I e 5 µL de T4 DNA Ligase, totalizando uma reação de 50 µL, e de composição final de: 50 mM Tris-HCl (pH 7.6); 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM ATP; 5% (w/v) PEG 8000; 1 mM DTT; 200 µg/ml de *Sal* I Adapters e 100 unidades/ml de T4 DNA Ligase. A reação de adição dos adaptadores foi feita a 16°C durante a noite.

Os cDNA foram novamente concentrados empregando a coluna Microcon YM-30 (Amicon), conforme descrito anteriormente.

### 5.4.4 Digestão com *Not* I

Os cDNA contendo os adaptadores *Sal* I ligados em suas extremidades foram ressuspendidos em 41 µL de água tratada com DEPC, com 5 µL de tampão de reação de *Not* I (REact 3 *Buffer*) e 4 µL da enzima *Not* I, em um volume final de 50 µL. A reação final foi incubada a 37°C por 2h. A composição final da reação foi de: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0); 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM NaCl e 1200 unidades/mL *Not* I.

Em seguida, os cDNA foram concentrados e lavados em coluna Microcon YM-30 (Amicon), como descrito anteriormente e ressuspendidos em 100 µL de tampão TEN (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 25 mM NaCl; autoclavado).

### 5.4.5 Fracionamento de cDNA por cromatografia em coluna

Após a digestão, foi realizado o fracionamento dos cDNA por cromatografia em coluna para a remoção de fragmentos de pequeno tamanho (< 500 pb), além da retirada de adaptadores residuais não ligados e de fragmentos originados da digestão por *Not* I que, conseqüentemente interfeririam na qualidade da biblioteca de cDNA. A



coluna, constituída da resina Sefacril (adsorvente), ao receber o tampão TEN (eluente) promove o fracionamento por filtração em gel (por exclusão) dos fragmentos de diferentes tamanhos.

Antes da eluição dos fragmentos de cDNA de *F. pedrosoi*, a solução de estoque da coluna (etanol 20%) foi drenada. Posteriormente foram feitas quatro lavagens na coluna com tampão TEN (cada lavagem com 0,8 mL) para remover o restante de etanol da coluna. Após a lavagem da coluna, seguiu-se a eluição dos cDNA. Os 100 µL de cDNA foram pipetados na coluna, e todo o material eluído foi coletado em um primeiro tubo tipo eppendorf. Depois foram adicionados 100 µL de tampão TEN à coluna, e o eluente foi recuperado em um segundo tubo. Foram adicionadas novas alíquotas de 100 µL de tampão TEN de modo que cada tubo, a partir do terceiro, recebeu uma única gota do eluente da coluna. Foram adicionadas alíquotas de 100 µL de tampão TEN até terem sido coletadas um total de 18 gotas; uma gota para os tubos numerados de 3 a 20. Após a coleta dos cDNA eluídos, foi medido o volume de eluente de cada tubo por meio de uma pipeta. Os valores dos volumes foram registrados na coluna A em uma tabela (Tabela 1), definida no protocolo do kit SuperScript (Invitrogen). Depois para a coluna B da tabela os valores dos volumes foram preenchidos de modo acumulativo, somando os volumes de cada fração (Tabela 1). Em seguida, foi identificada a fração cujo valor do volume acumulativo da coluna B estivesse o mais próximo, mas que não excedesse, de 550 µL (correspondente à fração 11). As frações coletadas após o volume de corte de 550 µL (correspondentes aos tubos 12 a 20) continham cDNA pequenos, adaptadores não-ligados, e fragmentos de adaptadores/iniciadores liberados dos cDNA pela digestão por *Not* I. Caso fossem usadas essas frações de 12 a 20, a construção da biblioteca estaria significativamente comprometida, com fragmentos clonados que não corresponderiam aos cDNA de interesse de *F. pedrosoi*.

Obtidas as frações de cDNA por cromatografia em coluna, as frações 7 a 11 de cDNA foram selecionadas para a ligação ao vetor pSPORT 1. As frações de cDNA selecionadas foram reunidas em um único tubo e concentradas em coluna YM-30 Microcon, para um volume final de 11 µL de tampão TEN segundo a recomendação do kit SuperScript (Invitrogen). Para assegurar o sucesso na construção da nossa

biblioteca, com clones apresentando insertos variados de cDNA de *F. pedrosoi*, o sistema de ligação foi definido pela adição de 5 µL (30 ng) de cDNA. Antes, a quantificação do cDNA fora feita a partir de 1 µL de cDNA no Nanodrop.

**Tabela 1.** Frações de cDNA de *F. pedrosoi* eluídas por cromatografia em coluna. As frações 7 a 11 foram escolhidas para o sistema de ligação.

No.	A Volume da fração (µL)	B Volume total (µL)
1	100	100
2	94	194
3	38,5	232,5
4	37,5	270
5	38	308
6	38	346
7	37	383
8	35	418
9	35	453
10	36	489
11	38	<b>527</b>
12	35	562
13	39	601
14	39	640
15	37	677
16	37	714
17	37	751
18	37	788
19	37	825
20	37	862

#### 5.4.6 Ligação de cDNA a pSPORT 1

Após a quantificação dos cDNA foram utilizados 30 ng de cDNA para ligar ao vetor pSPORT 1. O sistema final de ligação foi composto de 4 µL de tampão 5X T4 DNA ligase; 1 µL de pSPORT 1; 30 ng de cDNA (6,2 ng/µl); água tratada com DEPC completando o volume para 19 µl; e 1 µl de T4 DNA ligase. A composição final da reação foi de: 50 mM Tris-HCl pH 7.6; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM ATP; 5% (p/v) PEG 8000; 1 mM DTT; 2,5 µg/mL de DNA plasmidial, digerido por *Not I-Sal I*; 1,25 µg/mL de cDNA e 50 unidades/mL de T4 DNA ligase. A reação de ligação ocorreu a 4°C durante a noite.

#### 5.4.7 Precipitação do sistema de ligação

As construções moleculares de pSPORT 1 ligados aos cDNA de *F. pedrosoi* (sistemas de ligação) foram em seguida precipitados a partir da adição ordenada de: 5 µL de glicogênio (0,2 mg/µL); 6,25 µL de tRNA; 15 µL de 7,5 M NH<sub>4</sub>OAc e 85 µL de etanol absoluto (-20°C). Os componentes foram misturados completamente sob agitação em *vortex*, e em seguida foram centrifugados a 14000 g por 20 min. O sobrenadante foi cuidadosamente removido, e ao precipitado foi adicionado 0,5 mL de etanol 70% (-20°C). Os sistemas de ligação foram então centrifugados por 2 min a 14000 g. O sobrenadante foi removido e os sistemas ligados e precipitados foram mantidos a 37°C, por cerca de 15 min, até que todo o álcool evaporasse. Em seguida, foram finalmente ressuspensos em 3 µL de água milli-Q.

#### 5.5 Transformação por eletroporação

Os vetores com os insertos de cDNA foram clonados em células eletrocompetentes de *E. coli* ElectroMax DH10B (Invitrogen). Na transformação com o sistema de ligação pSPORT 1:cDNA de *F. pedrosoi* seguimos a sugestão do kit SuperScript (Invitrogen): os 3 µL de pSPORT 1:cDNA foram misturados a 80 µL de células ElectroMax DH10B. Os parâmetros de eletroporação utilizados foram: 2.5 kV, 100 Ω, 25 µF.

Imediatamente após a eletroporação, as células transformadas foram coletadas e transferidas para tubo tipo Falcon de 50 mL estéril contendo 1 mL de meio SOC. Em seguida foram colocadas sob agitação a 250 rpm, a 37°C por 1h. Em diluições seriadas (1 µL; 0,1 µL e 0,01 µL), transformantes foram semeados em placas em meio LB ágar, acrescido de ampicilina (100 µg/mL). O restante das células transformadas foi semeado em placas 20 x 20 cm em meio LB ágar com ampicilina (100 µg/mL). Todas as placas foram incubadas em estufa a 37°C durante à noite. No dia seguinte, foi feita a contagem dos clones das placas com as diluições seriadas para o cálculo da eficiência de transformação. Os clones das placas 20 x 20 cm foram coletados por raspagem com o auxílio de um rodo pequeno e estéril. Em seguida, os clones foram depositados em alíquotas de 500 µL, em glicerol 35% em tubos eppendorfs. Os tubos com os clones, representando a biblioteca de cDNA de *F. pedrosoi*, foram guardados em freezer a -80°C.

## 5.6 PCR de colônia dos clones transformados

Para revelar a variedade do tamanho dos insertos de cDNA de *F. pedrosoi* clonados nos vetores pSPORT 1 foi feita uma PCR de colônia de 15 clones da biblioteca escolhidos de modo randômico. Inicialmente, as células transformadas, diluídas em meio LB, foram semeadas em placas contendo LB ágar, ampicilina (100 µg/mL) e X-GAL (50 µg/ml). As placas com as células foram colocadas a 37°C durante a noite. No dia seguinte foram selecionadas 15 colônias brancas para o experimento de PCR. Os 15 clones foram coletados com ponteiras estéreis e inoculados em tubos de microcentrifuga, previamente identificados e mantidos em gelo para a reação de PCR. Cada tubo continha além do inóculo do clone: 0,2 mM de dNTP; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; tampão de PCR para concentração 1X (10X = 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,5); 0,2 µM dos iniciadores Universal e Reverso; 1 U de *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotec) e água milli-Q para um volume final de reação de 25 µL. Os parâmetros da PCR utilizados foram: 1 ciclo a 94°C por 3min; 30 ciclos consistindo das etapas: 94°C por 1 min; 48°C por 1min; 72°C por 1,5 min; e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos

da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose, conforme procedimento padrão.

### **5.7 Minipreparação de DNA Plasmidial em Placa *Deep Well***

Para o sequenciamento das amostras de cDNA de *F. pedrosoi*, foi realizada a extração de DNA plasmidial dos clones a partir da adaptação de um protocolo de minipreparação em placas *Deep Well* por Sambrook e Russel (2001). Os clones com os insertos de *F. pedrosoi* foram inoculados nos poços de placa *Deep Well* contendo: 1 mL de meio 2XYT; ampicilina (100 µg/mL) e glicose 0,5%. A placa foi selada com adesivo estéril; e o adesivo foi furado com agulha estéril, para facilitar a aeração dos poços. A placa com os clones foi incubada em agitador a 250 rpm, a 37°C por 22h. Decorrido o tempo de crescimento, estocamos parte dos clones em placa com glicerol 50% diluído no meio de cultura das células. O estoque de células foi guardado em freezer a -80°C. O restante das células foi centrifugado a 4000 rpm por 6 min para sedimentação. Em seguida, o sobrenadante foi descartado por inversão e os clones sedimentados foram ressuspendidos, por *vortex*, em 240 µL de solução GET (Glicose 1%; 0,01M EDTA; 0,3M Tris-HCl pH 7,4). Posteriormente foram centrifugados a 4000 rpm por 9 min, a 20°C. O sobrenadante de cada poço foi novamente descartado. As células foram ressuspendidas em 60 µL de GET, em *vortex*. Em uma placa nova de fundo “U” adicionamos a cada poço 1,25 µL de RNase A (20 mg/mL). Posteriormente os clones ressuspendidos da placa *Deep Well* foram transferidos para a placa nova de fundo “U” contendo RNase A. Adicionou-se a esses poços 60 µL de solução II (NaOH 0,2M; SDS 1%), preparada na hora. A placa de fundo “U” foi selada com adesivo novo e invertida 30 vezes para misturar bem os componentes de cada poço. Incubamos a placa por 10 min a temperatura ambiente. A placa foi submetida a uma breve centrifugação, e aos poços adicionamos 60 µL de solução KOAc 3M/ácido acético (armazenada em geladeira a 4°C). A placa foi selada com adesivo, e novamente invertida 30 vezes para garantir a mistura. A placa foi novamente incubada por 10 min a temperatura ambiente. Decorrido este tempo, a placa foi centrifugada a 4000 rpm, por 9 min, a 20°C. Todo o sobrenadante dos poços da placa de fundo “U” foi transferido para os

poços de uma placa nova, com filtro Millipore. A transferência dos sobrenadantes para a placa de filtro Millipore foi feita de maneira a evitar a retirada de material precipitado. Antes, a placa de filtro Millipore foi fixada com fita adesiva, em cima de uma placa de fundo “V”, de modo que os poços das placas de filtro Millipore ficassem perfeitamente sobrepostos aos poços da placa de fundo “V”. A placa de filtro Millipore (fixada na placa de fundo “V”) foi então centrifugada, sem tampa e sem selo, a 4000 rpm por 6 min, a 20°C. Após a centrifugação, a placa de Millipore foi removida e descartada. Ao filtrado da placa de fundo “V” foram adicionados 100 µL de isopropanol para precipitar DNA plasmidial dos clones. A placa de fundo “V” foi selada com adesivo e centrifugada a 4000 rpm por 45 min, a 20°C. O sobrenadante foi descartado, e aos poços foram adicionados 200 µL de etanol 70% gelado. A placa foi centrifugada a 4000 rpm por 5 min a 4°C. O sobrenadante novamente foi descartado. A placa foi colocada a temperatura ambiente de modo que todo o álcool evaporasse (cerca de 40 min). O DNA foi ressuscitado em 50 µL de água milli-Q. A placa foi selada e armazenada em geladeira durante a noite. No dia seguinte a placa foi estocada no freezer a -20°C.

Posteriormente, foi feita a análise eletroforética em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL dos vetores extraídos contendo insertos de cDNA de *F. pedrosoi*.

## **5.8 Amplificação e sequenciamento da biblioteca de cDNA de *F. pedrosoi***

O sequenciamento foi realizado empregando o kit “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystems) e o sequenciador automático “3130xl Genetic Analyser” (Applied Biosystems). Foi feito o sequenciamento de 480 clones (5 placas de 96 poços) da biblioteca de cDNA de *F. pedrosoi*.

A quantidade ideal de DNA plasmidial empregado no sequenciamento foi definida na faixa de 200 a 250 ng, segundo as recomendações do kit “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystems). A quantificação de nossas

amostras foi feita através do espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) a 260 nm.

Após a preparação das amostras de cDNA, foram preparadas as reações para sequenciamento em placas de 96 poços, em um volume final de 10  $\mu\text{L}$ , contendo: 4  $\mu\text{L}$  de DNA plasmidial (cerca de 250 ng); 0,5  $\mu\text{L}$  de BigDye<sup>®</sup> Terminator; 1,75  $\mu\text{L}$  tampão do sequenciamento do kit “BigDye<sup>®</sup>”; 1,5  $\mu\text{L}$  (2  $\mu\text{M}$ ) do iniciador M13 universal (sequenciamento a partir da região 5’ do cDNA) ou do reverso (sequenciamento a partir da região 3’ do cDNA); e 2,25  $\mu\text{L}$  de água milli-Q.

Após a pipetagem dos componentes, as placas foram agitadas em *vortex*, para homogeneizar os componentes da reação; e submetidas a uma breve centrifugação. Após a centrifugação, as placas foram levadas ao termociclador “Mastercycler gradient (epENDORF)” para amplificação das amostras de cDNA de *F. pedrosoi*. Para a PCR foram seguidas as seguintes etapas: inicial, 96°C por 1min; 32 ciclos de 96°C por 15 seg, 50°C por 15 seg, 60°C por 4 min; e final, mantida a 4°C.

Após o término da amplificação, foi feita uma breve centrifugação nas placas. Em seguida, os cDNAs amplificados foram precipitados em etanol e EDTA segundo o protocolo padrão do kit “BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit”:

#### Precipitação com etanol/EDTA

1. Adicionar 2,5  $\mu\text{L}$  de EDTA 125 mM em cada poço da placa.
2. Adicionar 30  $\mu\text{L}$  de etanol gelado 100% em cada poço.
3. Vedar a placa e agitá-la em *vortex* em velocidade baixa.
4. Incubar em temperatura ambiente por 15 min.
5. Centrifugar a 4000 rpm por 40 min. Seguir imediatamente para a etapa seguinte.
6. Inverter a placa e fazer breve centrifugação (“spin”) até 300 rpm.
7. Adicionar 60  $\mu\text{L}$  de etanol 70% em cada poço.
8. Centrifugar a 4000 rpm a 4°C por 15 min.
9. Inverter a placa e fazer “spin”.
10. Deixar a placa secar em temperatura ambiente por 1h30.

Após a precipitação, as amostras foram desnaturadas, seguindo o protocolo abaixo:

#### Desnaturação das amostras

1. Ressuspender as amostras em 10 µL de formamida Hi-Di™.
2. Levar a placa novamente ao termociclador por 3 min a 96°C. Seguir imediatamente para a etapa seguinte.
3. Manter em gelo por 2 min.
4. Retirar do gelo, e manter a temperatura ambiente.

Após a etapa de desnaturação, as placas foram postas no sequenciador automático “3130xl Genetic Analyser” (Applied Biosystems).

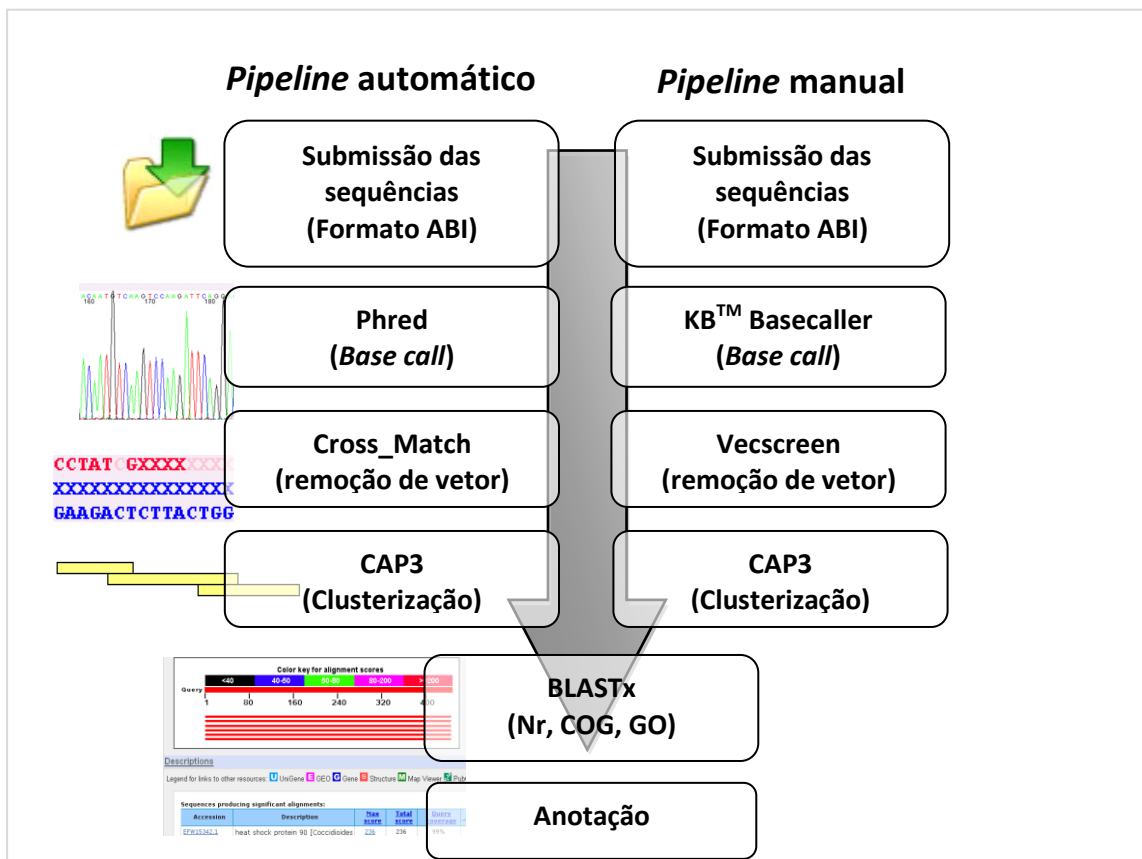
### **5.9 Análise das sequências de cDNA de *F. pedrosoi***

Após a geração do banco de ESTs de *F. pedrosoi* a partir do sequenciamento dos cDNA da biblioteca de *F. pedrosoi*, as sequências obtidas foram submetidas a análises de similaridade, empregando a ferramenta Blastx, com sequências depositadas no banco de dados do NCBI. Adicionalmente ao *pipeline* automático de análise PHPH, definido pelas ferramentas Phred, Cross Match e CAP3 (disponíveis em: <http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>), foram utilizadas manualmente as ferramentas KB Basecaller, Vecscreen e CAP3 (este último disponível no programa BioEdit) na tentativa de obter sequências de melhor qualidade de leitura. A Figura 5 resume a estratégia desenvolvida para a geração e análise das ESTs de *F. pedrosoi*, utilizando as ferramentas de bioinformática citadas.

O programa “Sequencing Analysis Software Version 5.2”, análogo ao programa Phred, é capaz de avaliar a qualidade (confiabilidade) das sequências obtidas do sequenciamento. A cada sequência oriunda do sequenciador automático um gráfico, chamado de eletroferograma, é gerado. O eletroferograma mostra a intensidade de fluorescência dos sinais emitidos de cada base nucleotídica captado pelo sequenciador automático. Quanto maior e mais definido for o pico de fluorescência da base nucleotídica, menor será a probabilidade de erro na leitura da base na sequência. É a



partir da avaliação dos picos no eletroferograma que os programas Phred e “KB Basecaller” quantificam e qualificam a acurácia (exatidão) das sequências geradas. O *KB Basecaller* possui um algoritmo mais sensível que o Phred e o “ABI Basecaller” (versão anterior ao *KB Basecaller*), de maior acurácia, que lhe permite maior leitura do comprimento da sequência, gerando sequências (ESTs) de tamanho maior e qualidade superior.

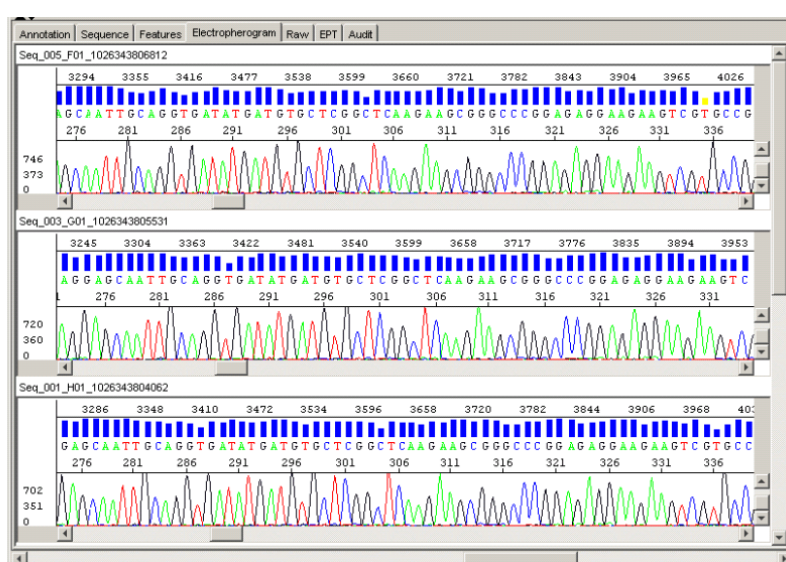


**Figura 5.** Esquema dos principais passos empregados para a geração e análise de ESTs de *F. pedrosoi*.

O *basecalling*, processo de avaliação destes gráficos, atribui a cada base lida um valor de qualidade de leitura, o “Quality Value” (“QV” ou “Q”), que é definido por meio de uma equação, desenvolvida pelo Phred, a qual estabelece uma relação logarítmica negativa entre a qualidade (QV) e a probabilidade de erro da base lida ( $P$ ) ( $QV = -10 \log_{10}P$  ou  $P = 10^{-QV/10}$ ) (Gibas & Jambeck, 2001). Assim, quanto maior for a pontuação recebida pela base, menor é a probabilidade de erro da leitura da base. O índice de QV varia entre 0 e 99; por exemplo,  $QV = 10$  indica que a probabilidade de uma determinada base não corresponder à leitura é de 10% (1/10) ou de estar correta é de

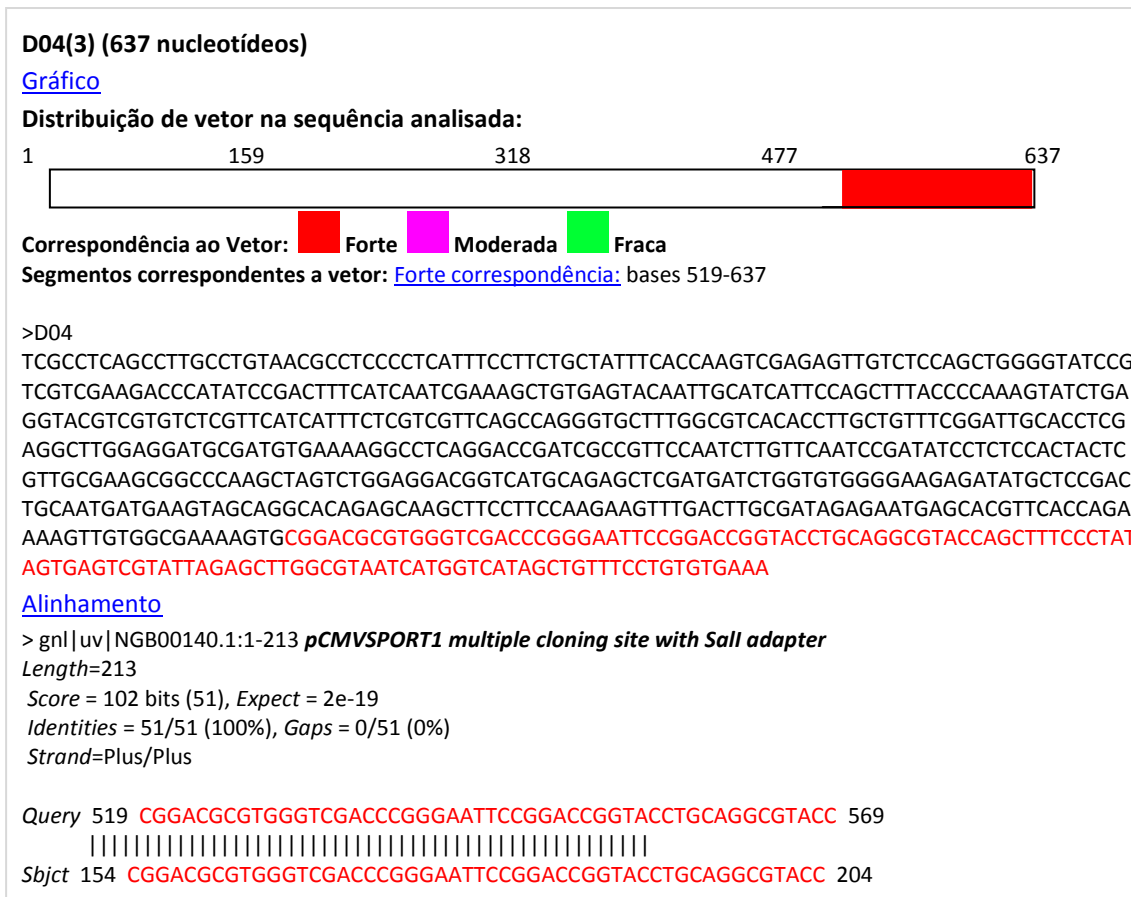
90%; QV = 20 indica que a probabilidade de erro na definição da base é de 1% (1/100) ou de acerto é de 99,9%, e assim sucessivamente (Ewing *et al.*, 1998).

Segundo Ewing *et al.* (1998), ESTs de qualidade baixa apresentam  $QV \leq 20$ ; ESTs de qualidade média apresentam  $15 \leq QV \leq 19$ ; e ESTs de qualidade alta apresentam  $QV \geq 20$  e tamanho da sequência  $\geq 100$  nucleotídeos. Portanto, foram escolhidas para análise de similaridade por Blastx, a partir dos eletroferogramas gerados, ESTs de *F. pedrosoi* que apresentavam  $QV \geq 20$  e tamanho  $\geq 100$  nucleotídeos, de acordo com as análises dos programas Phred e *Sequencing Analysis Software Version 5.2* (Figura 6).



**Figura 6.** Basecalling de eletroferogramas gerados após o sequenciamento automático examinados pelo KB Basecaller do programa Sequencing Analysis Software Version 5.2 (Applied Biosystems).

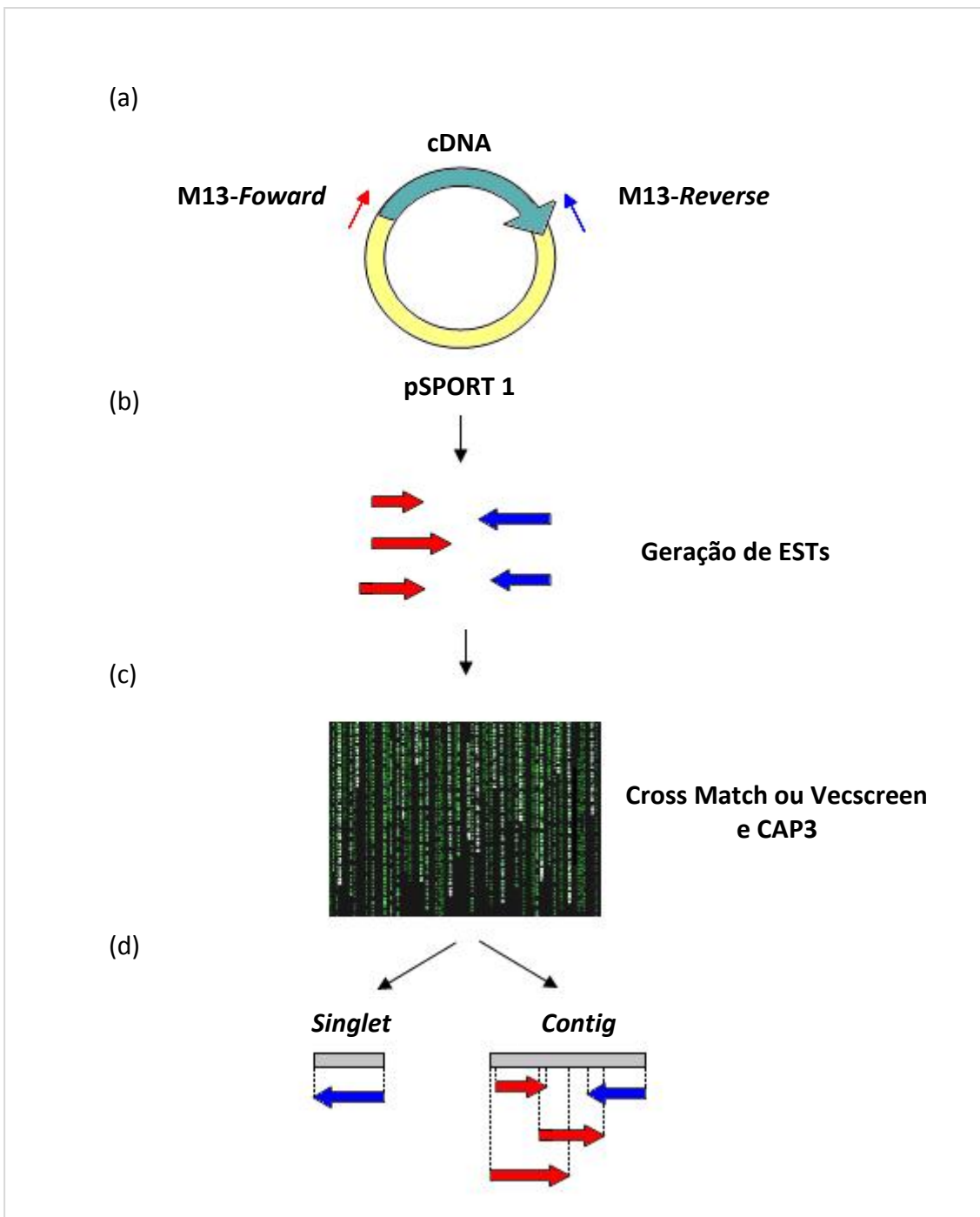
Após a seleção das sequências de *F. pedrosoi* de boa qualidade, empregamos os programas *Cross Match* e *Vecscreen* para a identificação e remoção das sequências correspondentes ao vetor (pSPORT 1 e seus adaptadores NotI e Sall). Os programas *Cross Match* e *Vecscreen* identificam os segmentos de DNA do vetor a partir da comparação dos fragmentos sequenciados contra um conjunto de sequências conhecidas de vetores, evitando assim a “contaminação por vetor” da sequência de interesse (Altschul *et al.*, 1997). No exemplo abaixo (Figura 7), evidencia-se o resultado do Vecscreen na sequência D04(3) de *F. pedrosoi*. A porção correspondente ao vetor (marcada em vermelho) deve ser retirada da sequência total.



**Figura 7.** Resultado da análise da sequência D04(3) de *F. pedrosoi* pelo programa Vecscreen.

Outra ferramenta importante nos projetos de sequenciamento é o programa CAP3, empregado na montagem de sequências relacionadas, a partir de alinhamentos de múltiplas sequências que possuem segmentos em comum, os quais se sobrepõem formando uma única sequência consenso chamada de *contig*. As sequências únicas, as quais não alinham, são chamadas de *singlets*.

A Figura 8 resume a estratégia da geração das sequências de cDNA de *F. pedrosoi* clonadas no vetor pSPORT 1 ao agrupamento das ESTs em *singlets* ou *contigs*. Após a formação das *contigs* e *singlets*, por meio das ferramentas de bioinformáticas citadas, as sequências podem ser finalmente submetidas à análise de similaridade por Blastx.



**Figura 8.** Esquema ilustrando a geração e agrupamento das ESTs de *F. pedrosoi*. (a) Clonagem dos insertos de cDNA de *F. pedrosoi* no vetor pSPORT 1, contendo as sequências para amplificação e sequenciamento dos iniciadores M13 Universal e Reverso; (b) amplificação dos insertos, gerando ESTs que representam regiões 5' ou 3' dos insertos; (c) análise computacional das ESTs pelas ferramentas Cross Match ou Vecscreen (filtro de vetor) e CAP3 (agrupamento das sequências similares); (d) resultado final das análises onde as sequências similares foram agrupadas em *contigs* e as sequências sem similares permaneceram como *singlets* (Adaptado de Procópio, 2006).

A ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) possibilita a busca em bancos de dados de sequências de nucleotídeos ou de proteínas similares à sequência de interesse consultada (“query”) (Altschul *et al.*, 1990).

O BLAST é uma família de programas, a qual inclui, entre outros: o blastn (“nucleotide-nucleotide blast”) - que busca e compara sequências de nucleotídeos depositadas no banco de dados de nucleotídeos com a sequência de nucleotídeo consultada; o blastp (“protein-protein blast”) - que busca e compara sequências de proteínas depositadas em banco de dados de proteínas com a sequência da proteína consultada e o blastx (“nucleotide 6-frame translation-protein”) - que faz a busca em um banco de dados de sequências de proteínas usando a sequência de nucleotídeo consultada traduzida nas seis possíveis fases.

A confiabilidade da análise por Blastx é determinada pelo valor esperado ou “E-value” (“Expect value”) que é uma pontuação conferida à cada sequência do banco de dados apontada como similar à sequência “query”. Quanto menor for ou mais próximo estiver o *E-value* de zero (0.0), mais significativo será a relação de similaridade da sequência consultada com a sequência do banco de dados. E ao contrário, quanto maior for o *E-value*, menos relevante será o resultado de similaridade obtido (Altschul *et al.*, 1990).

O *E-value* é calculado a partir do alinhamento entre as sequências analisadas. O alinhamento recebe uma pontuação que é calculada a partir das porcentagens de identidade, de similaridade e de lacunas entre os resíduos de aminoácidos (aas) alinhados entre as sequências comparadas. A identidade é definida pela razão entre o número de aas idênticos da sequência consultada com a sequência do banco. Similaridade indica a razão do número de aas de propriedades químicas semelhantes (apolar, polar neutro, ácido e básico) comuns entre as sequências. E lacunas corresponde ao número de aas não existentes de uma sequência comparada à outra nas regiões de alinhamento. Quanto maior a pontuação recebida do alinhamento, menor o *E-value*, e maior a significância da similaridade entre as sequências comparadas.

Outro parâmetro importante para discriminar o *E-value* é verificar a porcentagem de cobertura (“Coverage”) ente as sequências comparadas. A porcentagem de cobertura indica a extensão de sobreposição entre as sequências. Quanto maior a cobertura entre as sequências, mais relevante será o *E-value*, e consequentemente mais significativo a relação de similaridade entre as sequências. Entretanto, alinhamentos de regiões pequenas das sequências comparadas podem indicar *E-values* de alta relevância, mas que representam baixa porcentagem de cobertura entre as sequências. Ou seja, a similaridade entre as sequências pode se restringir a somente pedaços pequenos da sequência, como por exemplo, a regiões que codificam domínios da proteína. Assim, quanto maiores as sequências e maiores os alinhamentos, mais fiel será a relação de similaridade.

*E-value* < 10e-100 indicam que as sequências comparadas são idênticas, com alinhamentos longos entre elas. 10e-50 < *E-value* < 10e-100 significam que as sequências comparadas são quase idênticas, com um longo trecho da proteína consultada alinhada com a proteína do banco indicada. 10e-10 < *E-value* < 10e-50 relacionam sequências parecidas, podendo ter domínios ou outras características compartilhadas. 1 < *E-value* < 10e-6 podem indicar sequências homólogas, mas de baixa significância. *E-value* > 1 indicam proteínas diferentes, que aparentemente não estão relacionadas ([www.clcbio.com/index.php?id=995](http://www.clcbio.com/index.php?id=995)).

Adicionalmente, após o sequenciamento, foram amplificados por PCR cerca de 34 sequências de cDNA, que apresentavam interesse ao nosso trabalho. A análise por eletroforese em gel de agarose dos insertos serviu para comparar o tamanho observado das sequências clonadas de *F. pedrosoi* com o tamanho das sequências apontadas como similares na análise por Blastx. O tamanho observado das sequências foi complementado na coluna “tamanho” das tabelas da análise por Blastx. Para a amplificação dos fragmentos por PCR foram definidos os sistemas constituídos de: 0,5 µL de DNA plasmidial contendo o inserto clonado de *F. pedrosoi* (2 ng); 0,5 µL de cada um dos iniciadores 5’ e 3’ (0,2 µM); 1 µL de dNTPs (0,2 mM); 1 µL de cloreto de magnésio (2mM); 2,5 µL tampão *Taq* DNA polimerase (concentração final 1X); 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (1U) (Ludwig Biotec) e 18,8 µL de água milli-Q, para completar volume final de reação de 25 µL. Os parâmetros da PCR utilizados para os sistemas de

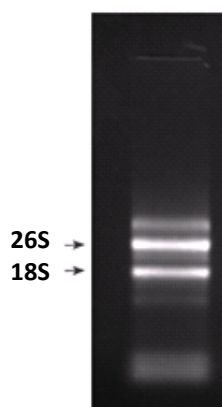
amplificação foram definidos por: 1 ciclo a 94°C por 3 min; 30 ciclos consistindo das etapas: 94°C por 1 min, 50°C por 1 min; 72°C por 2 min; e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 10 min. Após a amplificação, cerca de 1/5 (5 µL) de cada sistema de reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose, conforme procedimento padrão.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Extração de RNA total de *F. pedrosoi*

Foi utilizado cerca de 2 g do fungo *F. pedrosoi* para a extração de RNA total. O micélio foi macerado em nitrogênio líquido, e ao macerado (pó) do fungo foram adicionados 20 mL do reagente TRIZOL (Invitrogen). Seguindo as recomendações descritas pelo fabricante, recuperamos 1,55 mg de RNA total do fungo. A quantificação do RNA total de *F. pedrosoi* foi realizada por espectrofotometria empregando o Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Após a quantificação, uma alíquota correspondendo a cerca de 1,5 µg de RNA total de *F. pedrosoi* foi analisada por eletroforese em gel de agarose não-desnaturante (Figura 9). O perfil observado revela a integridade do RNA total, conforme evidenciado pelas bandas correspondentes aos RNA 18 e 26S (setas).



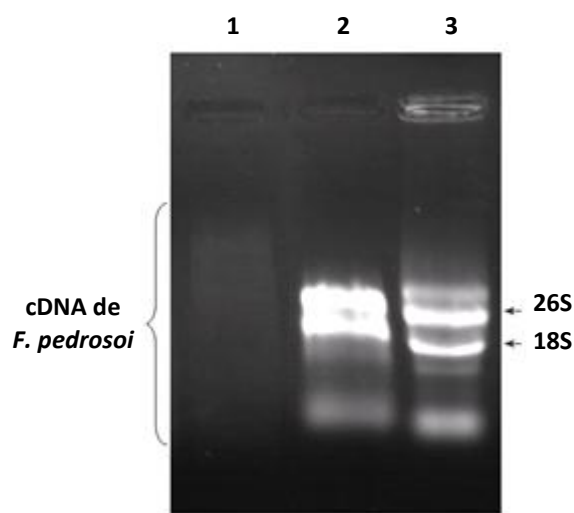
**Figura 9.** Análise eletroforética em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL, da amostra de RNA total de *F. pedrosoi*.

### 6.2 Construção da biblioteca de cDNA de *F. pedrosoi*

Após a extração do RNA total de *F. pedrosoi* com o reagente TRIZOL, isolamos a fração correspondente aos mRNA com o uso do kit “Dynabeads® Oligo (dT)<sub>25</sub>” (Invitrogen). Foram recuperados cerca de 1,9 µg de RNA poli (A)<sup>+</sup> a partir de 400 µg de RNA total.



Após a síntese da primeira e segunda fita de cDNA empregando o kit “SuperScript™ Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning” (Invitrogen), uma alíquota da reação de síntese da segunda fita de cDNA (12 µL, de 150 µL total) foi analisada por eletroforese em gel de agarose (Figura 10). Foi possível visualizar um rastro, evidenciando fragmentos de cDNA de tamanhos variados, conforme o tamanho dos rRNA analisados em paralelo das bandas (18S ~ 2 Kb e 26S ~ 4 Kb).



**Figura 10.** Análise eletroforética em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL, das amostras de cDNA; RNA poli A<sup>-</sup>; RNA total de *F. pedrosoi* (poços 1, 2 e 3 respectivamente). No poço 1, evidencia-se o rastro de cDNA de *F. pedrosoi*; nos poços 2 e 3; as setas apontam as bandas 26 e 18S de RNA ribossomal.

Após a realização das demais etapas, os fragmentos de cDNA foram ligados ao vetor pSPORT 1, como descrito no protocolo do kit empregado. Em seguida, uma alíquota da reação de ligação foi usada nos experimentos de transformação por eletroporação de células da linhagem comercial DH10B ElectroMAX (Invitrogen) de *E. coli*.

A eficiência de transformação das células *E. coli* DH10B com o sistema de ligação dos insertos de cDNA de *F. pedrosoi* foi de  $10^7$  clones/µg de DNA, resultado acima do mencionado pelo protocolo do kit empregado ( $10^6$  clones/µg de DNA).

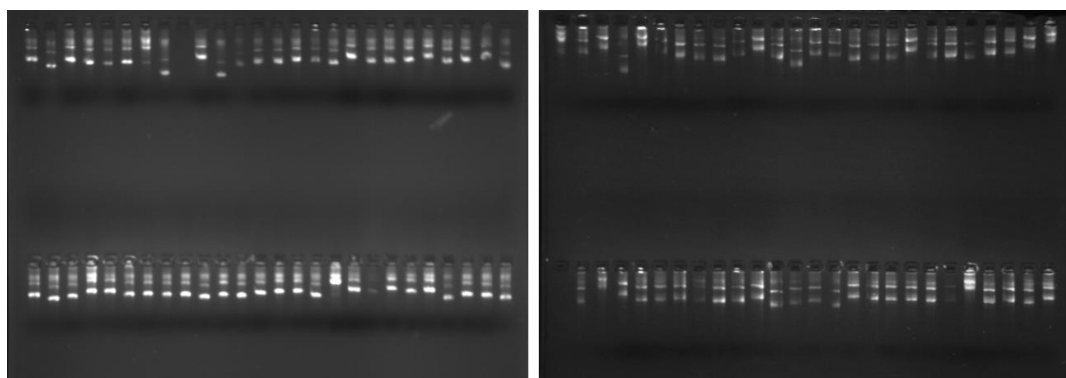
### 6.3 Representatividade da biblioteca de cDNA

Para a estimativa do tamanho das sequências de nossa biblioteca de cDNA de *F. pedrosoi* foi realizada a análise em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR de colônia do DNA plasmidial de alguns clones do banco. Na figura 11 pode-se observar o resultado da PCR de 15 clones selecionados aleatoriamente. Exceto para três clones (poços 4, 7 e 8 da Figura 11), a amplificação gerou fragmentos de DNA de diferentes tamanhos.



**Figura 11.** Análise eletroforética em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL, dos produtos da PCR a partir do DNA plasmidial de 15 clones recombinantes de *E. coli* DH10B. Marcador molecular (MM) utilizado: “1 kb DNA ladder plus” (Invitrogen).

Em seguida, o DNA plasmidial de diversos clones da biblioteca de cDNA de *F. pedrosoi* foram extraídos e submetidos ao sequenciamento. Uma análise representativa do perfil de DNA plasmidial obtido de 104 clones da biblioteca é mostrada na Figura 12. A biblioteca de cDNA de *F. pedrosoi* foi validada pelo sequenciamento e análise do banco.

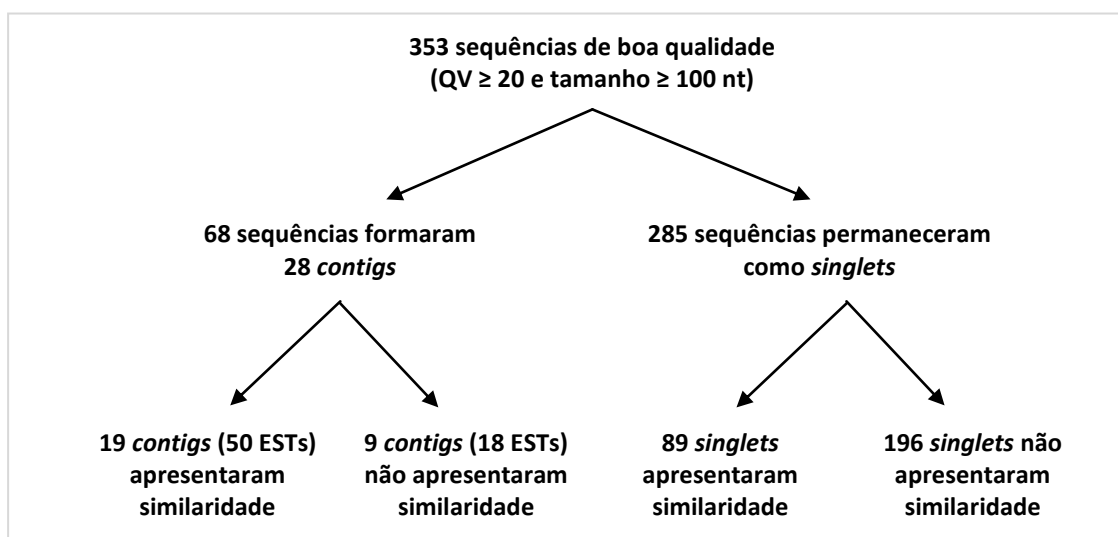


**Figura 12.** Análise eletroforética em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL, do DNA plasmidial de clones da biblioteca de cDNA de *F. pedrosoi*.

#### 6.4 Análise das sequências de cDNA de *F. pedrosoi*

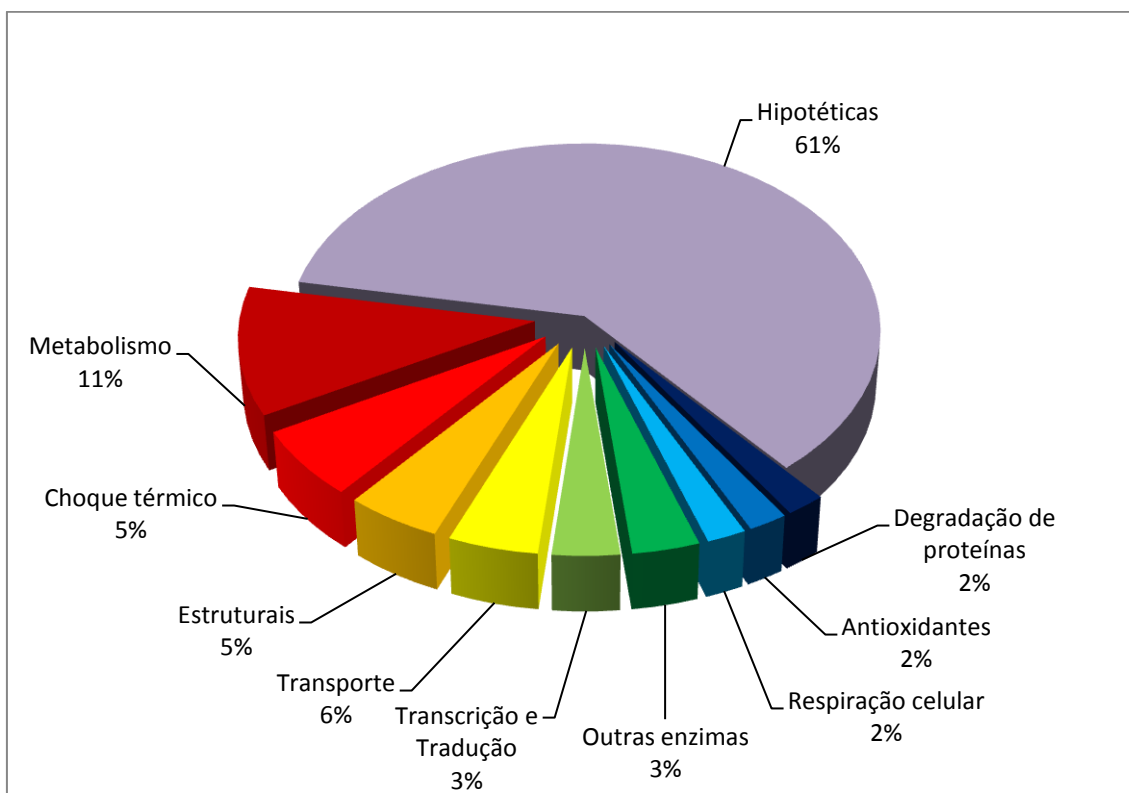
As sequências geradas foram submetidas ao *pipeline* de análise automático, conforme descrito na seção 5.9 da Metodologia. Alternativamente, estas sequências também foram submetidas à análise manual empregando outros programas equivalentes aos programas utilizados no *pipeline* de análise automática (Figura 5).

Após a seleção das ESTs de boa qualidade, a filtragem de vetor pelo CAP3 ou Vecscreen; e a formação de *contigs* e *singlets*, as sequências de *F. pedrosoi* foram comparadas com sequências depositadas nos bancos de dados. A análise de similaridade das ESTs de *F. pedrosoi* foi feita pela ferramenta Blastx, sendo as sequências do fungo traduzidas em proteína e comparadas com sequências de proteínas depositadas nos bancos de dados. A partir da análise de qualidade dos eletroferogramas das sequências, empregando a ferramenta Phred, 353 ESTs (*Expressed Sequence Tags*) de *F. pedrosoi* (qualidade  $\geq 20$  e tamanho  $\geq 100$  nucleotídeos) foram selecionadas. Dentre as 353 ESTs, 139 apresentaram similaridade com sequências de fungos e bactérias depositadas no banco de dados do NCBI. Destas 139 sequências, 50 foram agrupadas em 19 *contigs* e 89 permaneceram como *singlets*. O restante das ESTs que não apresentaram similaridade com sequências já descritas foram definidas como hipotéticas (Figura 13).



**Figura 13.** Agrupamento em *singlets* e *contigs* das 353 sequências da biblioteca de cDNA de *F. pedrosoi*, seguido da análise de similaridade com sequências depositadas no banco de dados do NCBI.

Conforme mostrado na Figura 14, dentre os genes identificados até o momento nesta análise parcial do transcrito de *F. pedrosoi*, destacam-se aqueles que codificam proteínas relacionadas à resposta a diferentes estresses (nutricional, oxidativo, e de choque térmico); transportadores de íons metálicos (especialmente de ferro e zinco); proteínas envolvidas na respiração celular; proteínas estruturais e proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos, lipídios e aminoácidos.



**Figura 14.** Caracterização do transcrito parcial de *F. pedrosoi*. A classificação funcional das ESTs de *F. pedrosoi* foi definida pela ferramenta KEGG Orthology (KO) (“Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”).

A seguir serão apresentadas tabelas contendo os dados das sequências relativas às principais categorias funcionais de genes de *F. pedrosoi* identificados neste trabalho. Foram selecionadas apenas as sequências cujo alinhamento apresentava uma cobertura mínima de 35% e  $E\text{-value} \leq 1e-10$ . Em anexo são apresentadas o restante das tabelas cujos transcritos de *F. pedrosoi* também foram identificados, mas não foram discutidos.

**Tabela 2.** Sequências de cDNA de *F. pedrosoi* anotadas como proteínas transportadoras pela análise de similaridade por Blastx. As sequências de *F. pedrosoi* foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados “Non-redundant protein sequences” (nr) do NCBI.

Sequência <sup>1</sup>	Tamanho <sup>2</sup>	Anotação Blastx <sup>3</sup>	Cobertura <sup>4</sup>	Identidade <sup>5</sup>	E-value <sup>6</sup>
Contig1: A01(4), A06(3)	784	- <a href="#">ref XP_001270210.1</a> provável transportador de múltiplas drogas MFS [ <i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1] (573 aa)	35%	82/93 (88%)	6e-42
		- <a href="#">ref XP_001816533.1</a> transportador de poliamina 3 [ <i>Aspergillus oryzae</i> RIB40] (552aa)	35%	82/92 (89%)	3e-41
A10(4)	719	- <a href="#">gb EFW13702.1</a> transportador de múltiplas drogas MFS [ <i>Coccidioides posadasii</i> str. Silveira] (561aa)	59%	70/166 (42%)	3e-21
A08(1)	378 (1700)	- <a href="#">EDP51015.1</a> : transportador de múltiplas drogas MFS [ <i>Aspergillus fumigatus</i> Af293] (605aa)	48%	42/61 (69%)	6e-18
Contig2: C03(1), D02(2), A02(3), D07(3)	887	- <a href="#">XP_001817152.1</a> : transportador 1 regulado por zinco [ <i>Aspergillus oryzae</i> RIB40] (351aa)	90%	184/270 (69%)	8e-88
G04(3)	1017	- <a href="#">ref XP_003000993.1</a> transportador de zinco de membrana [ <i>Verticillium albo-atrum</i> VaMs.102] (495aa)	39%	96/133 (72%)	9e-50
		- <a href="#">ref NP_012746.1</a> Zrt3p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c] (503aa)	41%	58/143 (41%)	5e-19
E07(2)	1030	- <a href="#">EFX02665.1</a> : permease de aminoácido [ <i>Grosmannia clavigera</i> kw1407] (806aa)	95%	155/211 (73%)	4e-76
F03(2)	470	- <a href="#">XP_001264818.1</a> : aminotransferase classe V [ <i>Aspergillus fumigatus</i> Af293] (386aa)	98%	100/155 (65%)	9e-54
C01(4)	763	- <a href="#">gb EFV83559.1</a> proteína TctC [ <i>Achromobacter xylosoxidans</i> C54] (325aa)	49%	117/126 (93%)	1e-47
H06(1)	1114 (2100)	<a href="#">ref XP_003009538.1</a> sideróforo, transportador de ferro 1 [ <i>Verticillium albo-atrum</i> VaMs.102] (615aa)	49%	106/184 (58%)	7e-56
C04(5)	401	- <a href="#">ref XP_001261554.1</a> provável sideróforo, transportador de ferro 1 (Sit1 [ <i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181] (577aa)	44%	32/59 (54%)	4e-13
C10(2)	445 (1200)	- <a href="#">XP_001401932.1</a> : transportador de manganês pdt1 [ <i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88] (575aa)	73%	81/116 (70%)	2e-31

<sup>1</sup> As sequências (*singlets*) foram nomeadas de acordo com a posição ocupada nos poços das placas sequenciadas; os números entre parênteses correspondem ao número da placa (1 a 5).

<sup>2</sup> O tamanho das sequências corresponde ao número de nucleotídeos de boa qualidade definidas pelo programa “Sequencing Analysis 5.2 Patch2”. O número entre parênteses, quando houver, refere-se ao tamanho da sequência estimada por análise eletroforética dos insertos de *F. pedrosoi* amplificados por PCR.

<sup>3</sup> Melhores resultados definidos pela análise por Blastx. Os códigos sublinhados representam os números de acesso das sequências do banco NCBI.

<sup>4, 5, 6</sup> Parâmetros das análises de similaridade, por Blastx, entre as sequências de cDNA de *F. pedrosoi* com as sequências do banco de dados do NCBI.

Observando a distribuição das funções dos transcritos de *F. pedrosoi* identificados pela análise de similaridade por Blastx e classificados segundo a ferramenta KEGG Orthology (KO) (“Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”), cerca de 6% do total de transcritos de *F. pedrosoi* possuíram similaridade com sequências dos bancos de dados do NCBI anotadas como transportadores (Figura 14). Destes, a maioria referem-se a transportadores pertencentes à Superfamília dos Facilitadores Maioritários (“Major Facilitator Superfamily” ou “MSF”).

A *contig1* de *F. pedrosoi* pela análise de similaridade por Blastx foi anotada como um provável transportador MFS. Outro resultado da análise da *contig1* apontou similaridade com o transportador de poliamina 3 (Tabela 2).

As poliaminas naturais como putrescina e espermidina são compostos orgânicos intracelulares ubíquos, sintetizados por todos os procaríotos e eucariotos estudados (Heby, 1981). As poliaminas desempenham papéis importantes na regulação da proliferação, diferenciação e morte celular. Em pH neutro as moléculas, carregadas positivamente, são capazes de interagir com inúmeras moléculas carregadas negativamente, incluindo DNA, RNA e fosfolipídios ácidos - as espermidinas e esperminas aumentam a rigidez da membrana, formando complexos com fosfolipídios e outras proteínas (Schuber, 1989).

Experimentos com mutantes depletados de poliaminas em *A. nidulans*, *N. crassa* e *S. cerevisiae* revelaram que as poliaminas são indispensáveis para uma taxa normal de crescimento. A deficiência na biossíntese de poliamina resulta na interrupção da proliferação celular, que, no entanto, pode ser reversível pela adição de poliaminas exógenas. A deficiência de poliaminas também pode resultar em morte celular programada ou apoptose (Rajam & Galston, 1985).

A maioria das células eucarióticas possui um sistema transportador de poliaminas, localizado na membrana celular, que possibilita a internalização de poliaminas exógenas. Quando a biossíntese de poliaminas é interrompida, a captação de poliaminas exógenas torna-se indispensável para a sobrevivência das células.

Adicionalmente, as poliaminas já foram relatadas como antioxidantes, prevenindo a peroxidação lipídica. Elas também foram implicadas na regulação de várias enzimas que se ligam a membranas, incluindo: adenilato ciclase, transglutaminase tecidual, canais iônicos como NMDA (*N*-metil-D-aspartato), KIR (canal retificador de influxo de potássio, K<sup>+</sup>) e canais de voltagem ativados por cálcio (Ca<sup>2+</sup>) (Wallace *et al.*, 2003).

A superfamília dos facilitadores maioritários (MFS) (Baldwin, 1993; Goswitz & Brooker, 1995; Griffith *et al.*, 1992; Henderson, 1991; Marger & Saier, 1993) junto com a superfamília de transportadores ABC de ligação a ATP (ABC) (Dean, 1995; Fath & Kolter, 1993; Higgins, 1992; Kuan *et al.*, 1995) constituem as duas maiores famílias de transportadores já descritas. Ambas as famílias são ubíquas em todos os organismos vivos estudados. Juntas, as famílias de transportadores MFS e ABC abrangem quase a metade de todos os transportadores de solutos codificados nos genomas de microorganismos, sendo também maioria nos eucariotos (Paulsen *et al.*, 2000).

As permeases da família ABC são em geral transportadores ativos primários multicompetentes, capazes de transportar tanto moléculas pequenas como macromoléculas em resposta a hidrólise de ATP. Já os transportadores MFS são carreadores secundários de apenas um polipeptídeo, capazes de transportar apenas pequenos solutos em resposta a gradientes de íons quimiosmóticos preexistentes (Paulsen *et al.*, 1997a).

Enquanto os transportadores ativos primários direcionam o acúmulo e a extrusão de solutos a partir da hidrólise de ATP, os carreadores secundários aproveitam a energia quimioestática originada do gradiente eletroquímico – provocado pelo unidirecionamento de moléculas bombeadas pelos transportadores primários – para o transporte ativo de solutos adicionais, simplesmente facilitando o transporte de uma ou mais espécies moleculares através da membrana.

Desse modo, os sistemas de transporte permitem a captação de íons e nutrientes essenciais ao organismo, além da excreção de produtos finais do

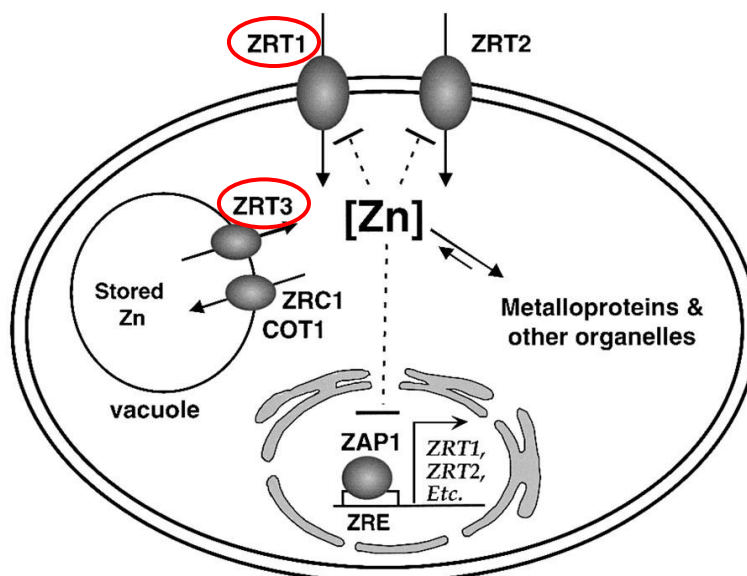
metabolismo e de substâncias deletérias; assim como promover a comunicação entre as células e o ambiente (revisto por Pao *et al.*, 1998).

A *contig2* apresentou maior similaridade com a sequência XP\_001817152.1, descrita como a proteína transportadora 1-regulada por zinco (Zrt1) de *A. oryzae*, com *E-value* igual a 8e-88, 90% de cobertura e 69% de identidade. Em *S. cerevisiae* foram descritos os sistemas de captação de zinco de alta e de baixa afinidade pelo íon metálico (Zhao e Eide, 1996a). A captação de zinco por alta afinidade é realizada pela proteína transportadora 1-regulada por zinco (Zrt1), e a captação do íon por baixa afinidade ocorre pela proteína transportadora 2-regulada por zinco (Zrt2) (Zhao e Eide, 1996b). Ambas as proteínas pertencem à família de transportadores de íons metálicos ZIP3 (Permeases de Ferro/Zinco), responsáveis pela captação de zinco para dentro das células (influxo) (figuras 15 e 16). As proteínas transportadoras reguladas por zinco estão presentes no citoplasma e em várias organelas, incluindo núcleo, retículo endoplasmático, Golgi, vesículas secretórias e mitocôndria. A expressão dos genes que codificam para essas proteínas, ZRT1 e ZRT2, respectivamente, é rigorosamente regulada pelas concentrações intra e extracelular de zinco (Vallee & Falchuk, 1993; Eide, 1997).

Zhao *et al.* (1997) sugerem que, em meio com altos níveis de zinco, a expressão do gene ZRT2 ocorre em um nível basal, e isso garantiria o suprimento de zinco às células. Em caso de severa limitação de zinco, o transportador Zrt1 seria induzido para prover a aquisição de zinco pela captação de alta afinidade. Em condições de escassez extrema de zinco, haveria a expressão de Zap1, que é um ativador transcricional dos genes do sistema de captação de zinco ZRT1 e ZRT2 em resposta ao zinco, desempenhando um papel importante na homeostase do íon zinco. Uma outra família de genes também envolvida no transporte de zinco, a CDF (Facilitadores de Difusão de Cátions), codifica proteínas envolvidas: na retirada (efluxo) de zinco das células (ZnT-1); no transporte de zinco para endossomos (ZnT-2); e na compartimentalização do íon intracelular para dentro de vacúolos ou organelas celulares (Zrc1 e Cot1) - para detoxificação ou armazenamento, em condições de excesso de zinco (Paulsen & Saier, 1997b, Ramsay & Gadd, 1997). Um outro transportador de zinco da família ZIP, o Zrt3, mobiliza o íon estocado para o citoplasma em células com limitação de zinco. Assim



como os genes ZRT1 e ZRT2, ZRT3 também é regulado pelo fator de transcrição Zap1, o qual em baixas quantidades de zinco, tem sua transcrição aumentada (MacDiarmid *et al.*, 2000) (Figura 15).



**Figura 15.** Mecanismos de homeostase de zinco em fungos. Entrada de zinco na célula via Zrt1 e Zrt2. No citoplasma, o metal liga-se a metaloproteínas ou é transportado para dentro de organelas. Em células repletas de zinco, Zrc1 e Cot1 transportam zinco para dentro de vacúolos, onde é estocado em uma forma menos tóxica. O fator de transcrição Zap1 é reprimido pela acumulação intracelular de zinco lábil. Quando zinco torna-se limitante, a atividade de Zap1 ativa o aumento da transcrição dos genes ZRT1, ZRT2 e ZRT3. O aumento na expressão do transportador Zrt3 mobiliza o estoque de zinco através de vacúolos no citoplasma para reabastecer zinco lábil no citoplasma. Em contraste, o gene ZRC1 também é induzido por Zap1, sugerindo a necessidade de manter o fluxo de zinco através do vacúolo em células em condições limitantes de zinco. Os círculos em vermelho indicam as proteínas Zrt1 e Zrt3 cujos transcritos foram identificados em *F. pedrosoi* neste trabalho (Adaptado de MacDiarmid *et al.*, 2000).

O resultado da análise Blastx da sequência G04(3) de *F. pedrosoi* revelou sua similaridade com um transportador de zinco de membrana vacuolar de *Verticillium albo-atrum*, com 39% de cobertura, 72% de identidade e *E-value* igual a  $9e-50$  (código de acesso: XP\_003000993.1). Um outro resultado da análise de Blastx da sequência G04(3) de *F. pedrosoi* apontou sua similaridade com a proteína Zrt3p de *S. cerevisiae*; com 41% de cobertura, 41% de identidade e *E-value* igual a  $5e-19$  (ref|NP\_012746.1|). Em *S. cerevisiae* foram descritas as proteínas de membrana vacuolar transportadoras de zinco Zrt3, Zrc1 e Cot1. Em células repletas de zinco, Zrc1 e Cot1 são responsáveis pela compartimentalização de zinco lábil para dentro de vacúolos, onde o íon é

estocado em uma forma menos tóxica. Em células com limitação de zinco, Zrt3 mobiliza zinco estocado nos vacúolos para o citoplasma, na forma lábil, para a manutenção da homeostase do íon (Eide, 1997) (Figura 15).

O zinco, juntamente com os íons de ferro e cobre, é um micronutriente essencial para os eucariotos: é cofator catalítico de várias enzimas e é componente estrutural crucial dos motivos de dedos de zinco, por exemplo. Como o zinco, diferentemente dos íons ferro e cobre, não possui atividade redox, sua acumulação excessiva dentro da célula pode ser tóxica. A toxicidade de zinco está associada a ligações inadequadas às proteínas ou cofatores, que pode interromper processos bioquímicos relevantes, como a respiração; além de gerar espécies reativas de oxigênio que danificam lipídios, proteínas e DNA, levando à morte celular. Pela importância biológica e pela toxicidade potencial do zinco, os mecanismos da célula de captar, armazenar e eliminar o íon metálico são extremamente regulados, em níveis transcricionais e pós-transcricionais, para assegurar a homeostase. Pela importância biológica adquirida pelos transportadores de zinco, esses transportadores tornaram-se altamente conservados filogeneticamente entre os eucariotos (Eide, 1997).

Alguns estudos revelaram a importância de zinco e seus transportadores na patogênese de fungos e bactérias. Tang *et al.* (2005) verificaram que o regulador de captação de zinco Zur é essencial para a virulência da bactéria patogênica de plantas *X. campestris*. Ammendola *et al.* (2007) descobriram que o sistema de captação de zinco por alta afinidade ZnuABC é necessário para a homeostase de zinco, além de contribuir para a virulência de *Salmonella enterica*.

Franke *et al.* (2006) revelaram que a proteína transportadora vacuolar Vac1p contribui para a virulência de *C. albicans*, pela via de Vps34p (“vacuolar protein sorting class III”). Vac1p é uma proteína de membrana periférica, com domínio fosfatidilinositol, que tem função de encaminhar vesículas a endossomos “tardios” (corpos multivesiculares). Vps34p é uma fosfatilinositol 3-quinase, capaz de fosforilar unicamente fosfatidilinositol para formar fosfatidilinositol (3)-fosfato.

Franke *et al.* (2006) produziram mutantes em *C. albicans* deletados de Vac1. Os resultados revelaram que os mutantes eram menos aptos a formar hifa, mesmo em diferentes meios indutores; eram incapazes de formar clamidósporos em meio de ágar com arroz; tinham menor capacidade de aderir à células epiteliais de humanos e de secretar proteinases aspartil; sendo avirulentas em modelo murino para candidíase sistêmica. Vac1 portanto é fundamental para a virulência de *C. albicans* no modelo estudado.

Mutantes para Vps34p eram avirulentos em modelo murino de candidíase sistêmica; sendo incapazes de formar hifas em diferentes meios, hipersensíveis a altas temperaturas e a estresse hiperosmótico, e possuíam capacidade reduzida de adesão à células humanas (Bruckmann *et al.*, 2000; Eck *et al.*, 2000). Günther *et al.* (2005) revelaram que a virulência de Vps34p deve-se a atividade quinase-lipídica da proteína. Um dos substratos de Vps34p é Vac1p. Por isso, Franke *et al.* especularam que Vac1p poderia ter um papel na virulência de *C. albicans*.

A detecção de transcritos de *F. pedrosoi* que codificam prováveis transportadores específicos de zinco, especialmente transportadores homólogos à Zrt1 e à Zrt3, podem constituir um mecanismo adaptativo do fungo para captação e mobilização de zinco em condições limitantes do íon no meio. Seria interessante avaliar também se estes prováveis transportadores de zinco são importantes para aderência de células do fungo à células endoteliais humanas, e no processo de dimorfismo de *F. pedrosoi* - na formação de hifas e/ou corpos escleróticos do fungo.

**Tabela 3.** Sequências de cDNA de *F. pedrosoi* anotadas como proteínas estruturais pela análise de similaridade por Blastx. As sequências de *F. pedrosoi* foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados “*Non-redundant protein sequences*” (nr) do NCBI.

Sequência	Tamanho	Anotação Blastx	Cobertura	Identidade	E-value
H03(4)	827	- <a href="#">ref XP_002143598.1</a> provável Cap20, proteína associada a patogênese [ <i>Penicillium marneffe</i> ATCC 18224] (188aa)	39%	61/109 (56%)	2e-28
A07(2)	530 (1100)	- <a href="#">ADP24744.1</a> : Actina [ <i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i> ] (271aa)	67%	120/120 (100%)	3e-63
F09(2)	517	- <a href="#">EFX03314.1</a> : proteína de parede celular ancorada por GPI [ <i>Grosmannia clavigera</i> kw1407] (209aa)	82%	106/148 (72%)	4e-53
B01(2)	542 (1650)	- <a href="#">XP_001934358.1</a> : EglC, endoglucanase beta-1,3- de parede celular ancorada por GPI [ <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP] (318aa)	99%	108/179 (61%)	6e-58
C07(2)	577 (900)	- <a href="#">XP_001390410.1</a> : EglC, endoglucanase beta -1,3 [ <i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88] (464aa)	50%	59/100 (59%)	3e-21
A12(3)	331	- <a href="#">XP_003190632.1</a> : molécula reguladora de adesão [ <i>Aspergillus oryzae</i> RIB40] (204aa)	98%	71/109 (66%)	2e-31
E10(2)	447	- <a href="#">XP_002384844.1</a> : provável glucanosiltransferase beta-1,3 [ <i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357] (531aa)	45%	46/68 (68%)	2e-19

Os parâmetros das análises de similaridade por Blastx das sequências de *F. pedrosoi* (Sequência, Tamanho, Anotação, ...) são descritos na legenda da tabela 2.

As sequências de *F. pedrosoi* evidenciadas na Tabela 3 foram anotadas pela análise de similaridade por Blastx com sequências que codificam proteínas da parede celular. Cerca de 5% dos transcritos de *F. pedrosoi* foram anotados como transcritos de proteínas de parede celular.

A sequência H03(4) de *F. pedrosoi* foi anotada como a proteína associada à patogênese Cap20. A proteína Cap20 foi descrita inicialmente no fungo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. Hwang *et al.* (1995) analisando eventos moleculares que ativavam a formação de apressórios de *C. gloeosporioides*, identificaram um transcrito do fungo, que era unicamente expresso durante a formação de apressórios quando em contato com a planta hospedeira. Os pesquisadores verificaram que a interrupção do gene no fungo resultava em uma redução drástica da virulência em frutas de abacate e tomate. O transcrito que codifica a proteína designada Cap20, estaria, portanto, envolvido na patogênese do fungo, auxiliando a formação de apressórios durante a infecção ao hospedeiro.

A descrição do transcrito de Cap20 em *F. pedrosoi* implica potencialmente em uma proteína que confere virulência ao fungo. A caracterização da proteína Cap20 em *F. pedrosoi* pode revelar mecanismos importantes do fungo durante a infecção ao hospedeiro, especialmente durante as etapas de adesão e internalização de partículas do fungo nas células hospedeiras.

A sequência A12(3) de *F. pedrosoi* foi anotada como uma molécula reguladora de adesão, com similaridade pela molécula reguladora de adesão de *A. oryzae*. A patogênese associada ao gênero *Aspergillus* é bem relatada em *A. fumigatus*, o principal agente etiológico da aspergilose em indivíduos imunossuprimidos. A infecção inicia-se pela inalação de conídios do fungo que evadem o sistema imune ao invadir células epiteliais e alveolares do hospedeiro. A germinação de conídios a hifas dentro das células do hospedeiro permitem a penetração do epitélio e do endotélio vascular. Ocasionalmente, em indivíduos imunossuprimidos pode ocorrer a disseminação do fungo através da corrente sanguínea (Bem-Ami *et al.*, 2010).

A caracterização da molécula reguladora de adesão codificada pelo transcrito de *F. pedrosoi* identificado neste trabalho poderá contribuir para o melhor entendimento da etapa de adesão de *F. pedrosoi* durante a cromoblastomicose.

**Tabela 4.** Sequências de cDNA de *F. pedrosoi* anotadas como proteínas envolvidas na respiração celular pela análise de similaridade por Blastx. As sequências de *F. pedrosoi* foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados “*Non-redundant protein sequences*” (nr) do NCBI.

Sequência	Tamanho	Anotação Blastx	Cobertura	Identidade	E-value
E06(4)	642	- <a href="#">ref XP_003068359.1</a> provável oxirredutase NADH-ubiquinona [ <i>Coccidioides posadasii</i> C735 delta SOWgp] (134aa)	55%	72/118 (61%)	3e-30
F07(4)	787	- <a href="#">gb EER36341.1</a> subunidade II da citocromo c oxidase [ <i>Ajellomyces capsulatus</i> H143] (224aa)	83%	154/183 (84%)	9e-85
E04(4)	818	- <a href="#">ref YP_001648739.1</a> subunidade III da citocromo c oxidase [ <i>Mycosphaerella graminicola</i> ] (269aa)	77%	157/211 (74%)	9e-69
G09(2)	381	- <a href="#">XP_002478727.1</a> : provável proteína carreadora mitocondrial [ <i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500] (330aa)	96%	97/122 (80%)	8e-45
A07(3)	727	- <a href="#">XP_002145937.1</a> : provável proteína mitocondrial carreadora de fosfato (Mir1) [ <i>Penicillium marneffeii</i> ATCC 18224] (315aa)	61%	129/148 (88%)	7e-67

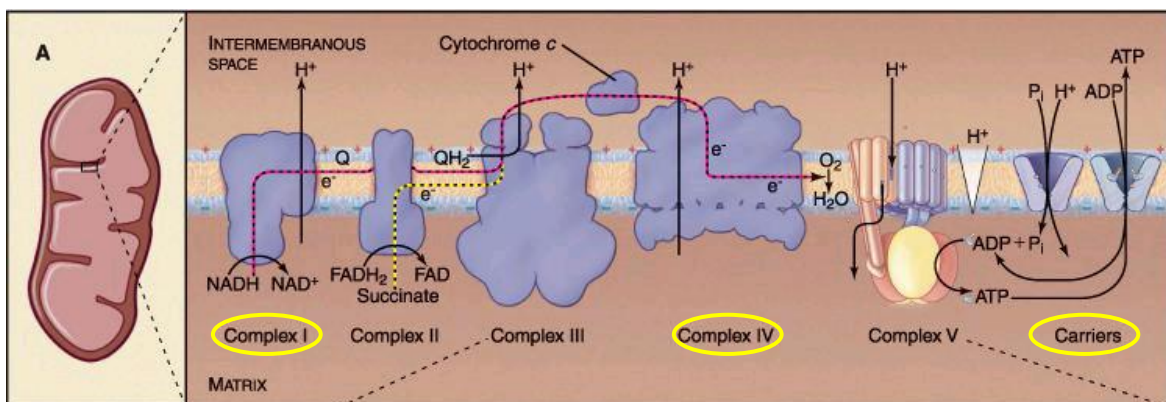
Os parâmetros das análises de similaridade por Blastx das sequências de *F. pedrosoi* (Sequência, Tamanho, Anotação, ...) são descritos na legenda da tabela 2.

Foram identificados transcritos de *F. pedrosoi* que apresentaram pela análise por Blastx similaridade com proteínas envolvidas na respiração celular, mais especificamente proteínas que constituem a cadeia transportadora de elétrons (ETC) (Tabela 4 e Figura 16).

A sequência E06(4) foi anotada com a proteína NADH-ubiquinona oxidoreductase. A proteína NADH-ubiquinona oxidoreductase corresponde ao complexo I na cadeia transportadora de elétrons.

A sequência F07(4) possuiu similaridade com a subunidade II da citocromo c oxidase de *Ajellomyces capsulatus* (gb|EER36341.1|) com 83% de cobertura, 84% de identidade e *E-value* igual a 9e-85. A sequência E04(4) pela análise por Blastx possuiu similaridade com a subunidade III da proteína citocromo c oxidase de *Mycosphaerella graminicola* (ref|YP\_001648739.1|) com 77% de cobertura, 74% de identidade e *E-value* igual a 9e-69. A citocromo c oxidase, constituída pelas subunidades transmembrânicas I, II e III é definida como o complexo IV da ETC.

A sequência A07(3) pela análise por Blastx foi anotada como uma provável proteína mitocondrial carreadora de fosfato (Mir1).



**Figura 16.** Esquema da cadeia transportadora de elétrons na matriz mitocondrial, evidenciando os cinco complexos e carreadores de fosfato inorgânico (Pi) envolvidos na síntese de ATP. Os círculos em amarelo evidenciam os complexos proteicos I, IV, V e carreadores de Pi cujos transcritos foram identificados em *F. pedrosoi*. (retirado de [www.acervosaude.com.br/images/004.png](http://www.acervosaude.com.br/images/004.png))



**Tabela 5.** Sequências de cDNA de *F. pedrosoi* anotadas como proteínas relacionadas ao estresse oxidativo pela análise de similaridade por Blastx. As sequências de *F. pedrosoi* foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados “*Non-redundant protein sequences*” (nr) do NCBI.

Sequência	Tamanho	Anotação Blastx	Cobertura	Identidade	E-value
Contig6: G10(1) D12(3)	772	- <a href="#">AAN39883.1</a> : oxidase alternativa mitocondrial [ <i>Emericella nidulans</i> ] (354aa)	57%	114/148 (77%)	2e-64
F04(2)	485 (500)	- <a href="#">EEH19342.1</a> : oxidase alternativa [ <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb03] (352aa)	50%	54/86 (63%)	2e-24
H03(3)	1015	- <a href="#">ref XP_751672.1</a> superóxido dismutase de manganês SodB [ <i>Aspergillus fumigatus</i> Af293] (229aa)	57%	135/196 (69%)	5e-68
Contig7: C01(2) F12(2)	588	- <a href="#">XP_001939504.1</a> : tiorredoxina [ <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP] (111aa)	52%	61/102 (60%)	3e-25
B02(1)	360 (850)	- <a href="#">XP_002340162.1</a> : provável tiorredoxina [ <i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500](286aa)	37%	34/45 (76%)	5e-13

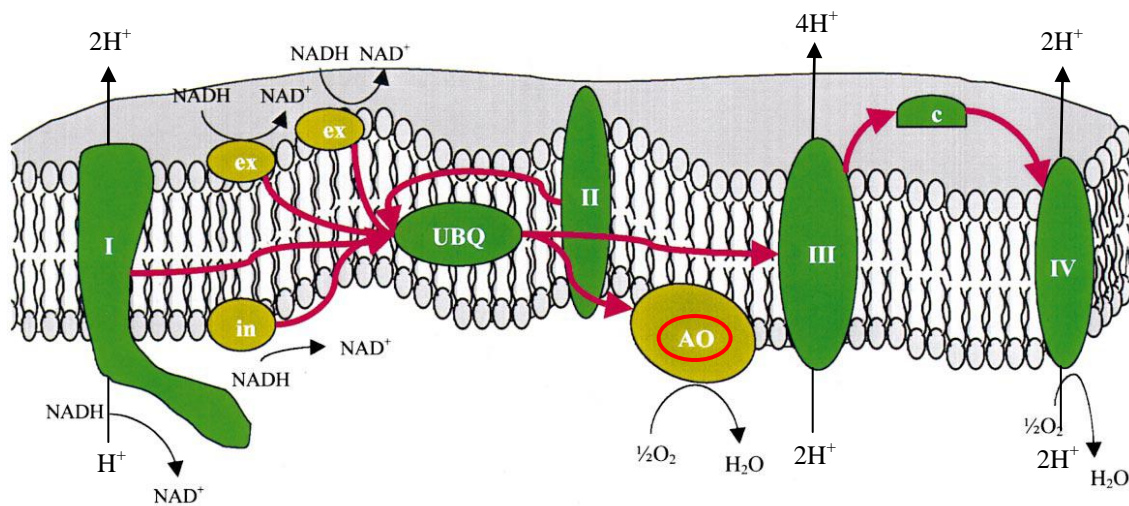
Os parâmetros das análises de similaridade por Blastx das sequências de *F. pedrosoi* (Sequência, Tamanho, Anotação, ...) são descritos na legenda da tabela 2.

A caracterização do transcrito parcial de *F. pedrosoi* revelou transcritos que codificam proteínas relacionadas ao estresse oxidativo; envolvidas na decomposição de espécies reativas de oxigênio (EROs), como a oxidase alternativa mitocondrial (Aox), a superóxido dismutase de manganês SodB e tioredoxinas citoplasmáticas (Tabela 5).

A *contig6* constituída pelas sequências G10(1) e D12(3) apresentou similaridade, por *Blastx*, com o gene que codifica a enzima oxidase alternativa mitocondrial de *Emericella nidulans* - forma sexuada ou teleomórfica de *Aspergillus nidulans*, (código de acesso: AAN39883.1). A enzima oxidase alternativa (Aox), presente na membrana mitocondrial interna de plantas, e de alguns fungos e protozoários, participa de uma via alternativa de oxidação da cadeia transportadora de elétrons na respiração celular (Moore & Siedow, 1991; Hoefnagel *et al.*, 1995; McIntosh, 1994; Vanlerberghe & McIntosh, 1997).

Na via alternativa, mediada por Aox, os elétrons na fosforilação oxidativa que passam pela ubiquinona ao invés de seguirem para os complexos III e IV na via clássica da cadeia são direcionados à oxidase alternativa mitocondrial (Figura 17). Assim como na via clássica da cadeia transportadora de elétrons, na via alternativa mitocondrial ocorre a transferência de elétrons ao oxigênio, reduzindo-o à água. No entanto, diferentemente da via clássica, na via alternativa, a translocação de prótons ao citosol só ocorre pelo complexo I. Consequentemente há uma diminuição na geração da força próton-motriz na membrana, que é indispensável para síntese de ATP pela enzima  $F_1F_0$  ATPsintase (Moore *et al.* 1978). Desse modo, quando a fosforilação oxidativa pela via clássica é desviada para a via alternativa, a síntese de energia (ATP) é diminuída – a energia liberada entre ubiquinol e o oxigênio, não acoplada ao bombardeamento de prótons, é dissipada na forma de calor. A presença ubíqua da oxidase alternativa em vários organismos, como plantas termogênicas e não-termogênicas (Moore & Siedow, 1991), protozoários (Chaudhuri *et al.*, 1996; Jarmuszkiewicz *et al.*, 1998), algas (Dinant *et al.*, 1998), fungos dimórficos (Johnson *et al.*, 2003) e filamentosos (Kirimura *et al.*, 1999) revelou aos pesquisadores novas características fisiológicas importantes de Aox.

## INTER MEMBRANE SPACE



## MATRIX

**Figura 17.** Esquema da cadeia transportadora de elétrons em mitocôndria de fungos. complexo I - NADH desidrogenase; complexo II - succinato desidrogenase; complexo III - ubiquinolcitocromo c; complexo IV - citocromo oxidase; ex - NADH:ubiquinona desidrogenase externa; in - NADH:ubiquinona desidrogenase interna; UBQ - pool de ubiquinona:ubiquinol; AO - oxidase alternativa; c - citocromo c. As setas em rosa indicam a direção do fluxo de elétrons. O círculo em vermelho indica a proteína oxidase alternativa (AO) cujo transcrito foi identificado em *F. pedrosoi* (Adaptado de Joseph-Horne *et al.*, 2001).

Pesquisadores descobriram que a via alternativa de oxidação pela enzima oxidase alternativa é resistente a inibidores da via clássica, como cianeto (terminologia da via alternativa: ciano-resistente), azida e monóxido de carbono, que inibem o complexo IV; e antimicina A, que age entre os citocromos b e c, no complexo III (Ikuma, 1972; Solomos, 1977). Em compensação, a via alternativa é inibida especificamente por ácido salicilhidroxâmico (SHAM), ácido benzil hidroxâmico (BHAM ou n-propil galato), tiocianato de potássio, 8-hidroxilamina e  $\alpha, \alpha'$ -dipiridila (Vanlerberghe & McIntosh, 1997; Ikuma, 1972).

Nos fungos *Neurospora crassa* e *Hansenula anomala* quando a via citocromo c oxidase era inibida, os níveis dos transcritos do gene nuclear AOX1, que codifica Aox, e a quantidade da enzima eram aumentados. Os resultados apontam para ativação da via alternativa por Aox quando a via citocromo c oxidase é interrompida (Q. Li *et al.*, 1996; Sakajo *et al.*, 1993). A resistência da via alternativa a inibidores da via clássica sugere ao organismo um mecanismo adaptativo que permitiria a manutenção da respiração celular, mesmo após a exposição de inibidores potentes da via citocromo c oxidase.

Inicialmente, pesquisadores imaginaram que a via alternativa por Aox seria ativada quando houvesse hiperfluxo de elétrons em direção ao complexo III na via clássica da respiração. Aox agiria para desviar elétrons que estariam saturando a via clássica de oxidação (Palmer, 1976; Lambers, 1982). Recentemente, foi mostrado que Aox, na presença de piruvato, na verdade compete por elétrons com a via clássica da fosforilação oxidativa, mesmo quando a via não está saturada (Hoefnagel *et al.*, 1995). Em ambos os casos, Aox agiria de forma a diminuir a redução dos complexos III e IV da via clássica da cadeia transportadora de elétrons, equilibrando o balanço de oxidação/redução dos complexos (Hoefnagel *et al.*, 1995). Consequentemente, mantendo os complexos III e IV oxidados, haveria menor síntese de ATP e de EROs pela via clássica. A ativação de Aox, portanto, seria desejada para corrigir uma condição de estresse oxidativo do organismo, diminuindo a produção de EROs na respiração ao competir com elétrons da via clássica de oxidação. Reforçando essa hipótese, alguns estudos revelaram que a expressão do gene AOX pode ser estimulada em condições de estresse, como baixas temperaturas, espécies reativas de oxigênio (EROs) e na infecção de patógenos (Vanlerberghe & McIntosh, 1997; Wagner AM, 1995). Desse modo, Aox atuaria como agente antioxidante contra espécies reativas de oxigênio (EROS) gerados da respiração e da infecção (Papa *et al.*, 1997; Missall *et al.*, 2004).

As vias respiratórias clássica e alternativa estariam, assim, reguladas em função do balanço de oxidação/redução de ubiquinona e de carbono, em resposta aos níveis de ATP citosólicos (Siedow & Umbach, 2000).

Maxwell *et al.* (1999), em experimentos com cultura de células transgênicas de tabaco que possuíam níveis alterados de Aox, verificaram que a via alternativa de oxidação por AOX era ativada para diminuir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), originadas de mitocôndrias na respiração celular. Em células mutantes de tabaco que apresentavam baixo nível de Aox, a formação de espécies reativas de oxigênio aumentava em relação às células tipo selvagem; indicando, portanto, o envolvimento da Aox na regulação de espécies reativas de oxigênio (EROs).

A produção de EROs é intrínseca dos processos metabólicos aeróbicos da redução de oxigênio, especialmente da respiração, e se tais espécies não forem rapidamente removidas ou detoxificadas podem provocar danos à várias moléculas, além de morte celular por apoptose.

Adicionalmente, na infecção, células fagocíticas podem utilizar o estresse oxidativo como defesa contra patógenos intracelulares (Westwater *et al.*, 2005). Macrófagos e neutrófilos por meio de reações oxidativas do complexo NADPH oxidase reduzem o oxigênio à EROs nos fagossomos, provocando estresse oxidativo aos patógenos fagocitados (Missall *et al.*, 2004). Alguns patógenos mesmo no ambiente hostil de fagossomos conseguem resistir ao estresse oxidativo, pois produzem enzimas antioxidantes que detoxificam as EROs, como a oxidase alternativa, a catalase, e a superóxido dismutase.

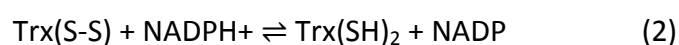
A sequência H03(3) pela análise de Blastx, possuiu similaridade com a proteína superóxido dismutase de manganês SodB, de *Penicillium marneffe* (XP\_002151294.1). As enzimas superóxido dismutase (SOD) catalizam a dismutação de ânions superóxidos a peróxidos de hidrogênio e oxigênio (Fridovich, 1978, McCord *et al.*, 1971). Experimentos com mutantes com deleções individuais para sodA ou sodB de *E. coli* reforçaram a função das superóxidos dismutases como defensoras das células contra a toxicidade de superóxidos (Touati, 1988). Juntamente com outras enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase desempenha papel protetor às células contra os efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio (EROs). Os peróxidos de hidrogênio, por sua vez podem ser detoxificados pelas enzimas catalase, glutarredoxinas e tiorredoxinas.

As sequências C01(2) e F12(2) constituem a *contig7*, que pela análise por Blastx, possuiu similaridade com a EST XP\_001939504.1, anotada como uma tiorredoxina (Trx) de *Pyrenophora tritici-repentis*, de 111 resíduos de aminoácidos, com cobertura de 52%, identidade de 60% e *E-value* de 3e-25. A mesma análise da *contig7* revelou similaridade com a tiorredoxina Trx1p de *S. cerevisiae* (gb|E61334.1|), de 103aa, com cobertura de 51%, identidade de 55% e *E-value* de 4e-16.

A *singlet* B02(1) também foi apontada como uma provável tiorredoxina, com similaridade pela provável tiorredoxina de *Talaromyces stipitatus* (XP\_002340162.1), de 286 resíduos de aminoácidos, com cobertura de 37%, identidade de 76% e *E-value* igual a 5e-13.

As tiorredoxinas (Trx) são proteínas pequenas – com cerca de 12 kDa, da classe de oxidoredutases – que catalizam a redução de outras proteínas, por meio de um sítio ativo composto de dois resíduos de cisteína altamente reativos e conservados em bactérias, fungos, plantas e mamíferos (Holmgren, 1989). Na Figura 18 evidenciam-se os resíduos de cisteína que constituem o sítio ativo da tiorredoxina de *P. tritici-repentis*.

A tiorredoxina reduzida, com seus resíduos de cisteína na forma de ditiol (SH)<sub>2</sub>, reduz proteínas com pontes dissulfeto (S-S) à ditiol. A reação redox envolve a doação de elétrons dos grupos tiol para as pontes dissulfeto. Desse modo, as tiorredoxinas antes reduzidas Trx(SH)<sub>2</sub>, são oxidadas à pontes dissulfeto Trx(S-S), e as proteínas antes oxidadas são reduzidas à grupos tiol (reação 1). Para uma nova catálise, as tiorredoxinas oxidadas são reduzidas pelas tiorredoxinas redutases (Trr) com elétrons doados por NADPH (reação 2):



Em *E. coli*, as tiorredoxinas foram inicialmente descritas como doadoras de elétrons à enzima ribonucleotídeo redutase, para redução de ribonucleotídeos a desoxirribonucleotídeos na síntese de DNA (Laurent *et al.*, 1964). Trabalhos posteriores

revelaram em *E. coli*, que as tiorredoxinas também atuam na redução das enzimas 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS) redutase e metionina sulfóxido redutase, envolvidas na assimilação de enxofre (Tsang & Schiff, 1976; Ejiri *et al.*, 1979).

```

> ref|XP\_001939504.1 thioredoxin [Pyrenophora tritici-repentis Pt-1C-BFP]
gb|EDU42223.1 thioredoxin [Pyrenophora tritici-repentis Pt-1C-BFP] Length=111

GENE ID: 6347460 PTRG 09172 | thioredoxin [Pyrenophora tritici-repentis Pt-1C-BFP]

Score = 119 bits (297), Expect = 3e-25
Identities = 61/102 (60%), Positives = 71/102 (70%), Gaps = 3/102 (3%)
Frame = +3

Query 3      KSSYNTSIVQAPADRLVVLDCFATWCGPCKVIAPEVAKFSESddfdkdvdfykvdvdEVP 182
              +S +      A D L+VLDCFATWCGPCKVIAP+V KFSE+                      EVP
Sbjct 12     QSKADFDAAMADHDTLMVLDCFATWCGPCKVIAPQVVKFSEAYPNARFYKIDVD---EVP 68

Query 183    DVAQELGVRAMPTFMIFKNGEKVAEVVVGANKHALEAAIRKNL 308
              DVAQELG+RAMPTF+ FK G+KVAEVVGAN ALEAAI+ N+
Sbjct 69     DVAQELGIRAMPTFLFFKGGDKVAEVVVGANPKALEAAIQSNI 110

```

**Figura 18.** Resultado da análise por Blastx da *contig7* de *F. pedrosoi*. No alinhamento, a *contig6* possuiu similaridade com uma tiorredoxina de *P. tritici-repentis*. Em vermelho e azul, evidenciam-se os resíduos de cisteína (C), glicina (G) e prolina (P) do sítio ativo conservado da proteína.

Em *S. cerevisiae* foram descritos os sistemas tiorredoxina citoplasmático e mitocondrial. O sistema tiorredoxina citoplasmático é composto pelas tiorredoxinas Trx1 e Trx2, e a tiorredoxina redutase Trr1 (Gan, 1991). O sistema tiorredoxina mitocondrial é constituído pela tiorredoxina Trx3 e pela tiorredoxina redutase Trr2 (Pedrajas *et al.*, 1999).

Assim como em *E. coli*, em *S. cerevisiae* as tiorredoxinas citoplasmáticas Trx1 e Trx2 – codificadas respectivamente pelos genes TRX1 e TRX2, reduzem a ribonucleotídeo redutase e a 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS) redutase (Met16) (Gonzalez *et al.*, 1970).

Em *S. cerevisiae*, o sistema tiorredoxina citoplasmático teria função que se sobreporia à da glutaciona redutase (GR): reduzir glutaciona na forma oxidada (GSSG) à forma reduzida (GSH). Mutantes deletados para as tiorredoxinas Trx1 e Trx2 ( $\Delta trx1\Delta trx2$ ), assim como mutantes deletados para glutaciona redutase ( $\Delta glr1$ ) acumulavam níveis similares de glutaciona oxidada. Enquanto mutantes com triplo nocautes para as tiorredoxinas 1 e 2 e glutaciona redutase ( $\Delta glr1\Delta trx1\Delta trx2$ ) eram inviáveis em condições aeróbicas (Muller, 1996). Draculic *et al.* (2000) revelou ainda que

uma única tiorredoxina ou glutaredoxina citoplasmática seria essencial para a viabilidade de *S. cerevisiae*.

O sistema tiorredoxina mitocondrial parece ser incapaz de substituir os sistemas tiorredoxina citoplasmático ou glutathiona/glutaredoxina (Draculic *et al.*, 2000), e estaria implicado no combate ao estresse oxidativo provocado da respiração celular (Pedrajas *et al.*, 1999).

Ambos os sistemas tiorredoxina e glutathiona/glutaredoxina ajudam na manutenção do estado redox das células e na detoxificação de espécies reativas de oxigênio (EROs), especialmente na redução de peróxidos de hidrogênio à água, doando elétrons à peroxidases (Schallreuter & Wood, 1986; Spector *et al.*, 1988). Os sistemas tiorredoxina e glutathiona/glutaredoxina são descritos como linhas de defesa contra o estresse oxidativo, detoxificando EROs e auxiliando no reparo de proteínas com danos oxidativos.

Leveduras mutantes de *S. cerevisiae* com deleção de apenas um dos genes TRX1 ou TRX2 não tiveram alteração no crescimento ou morfologia de suas células, mas em leveduras com deleções de ambos os genes, o ciclo celular foi afetado, com a fase S prolongada e a fase G1 diminuída, quando comparadas com leveduras nativas (Muller, 1991). O aumento na fase S indica retardo na taxa de replicação de DNA. Os resultados indicaram que as tiorredoxinas são necessárias para uma taxa rápida de replicação de DNA. O sistema tiorredoxina garantiria assim o suprimento de equivalentes redutores para a enzima ribonucleotídeo redutase.

Além disso, mutantes com dupla deleção para tiorredoxina tornaram-se auxotróficas para metionina/cisteína - as leveduras mutantes para tiorredoxina eram incapazes de sobreviver em meio contendo sulfato como única fonte de enxofre metabólico (Muller, 1991). As tiorredoxinas teriam, portanto, papel fundamental na redução de PAPS redutase e metionina sulfóxido redutase.

Spector *et al.* (1988) revelaram a partir de experimentos *in vitro* e em células epiteliais da lente ocular de bezerros, que a adição exógena de tiorredoxinas de *E. coli*



confere papel reparador a proteínas com danos oxidativos, além de detoxificar diretamente EROs, como o peróxido de hidrogênio.

Em experimentos semelhantes, Fernando *et al.* (1992) verificaram que em células epiteliais de bovinos, as tioredoxinas endógenas, previamente isoladas do fígado, também atuam na regeneração de proteínas inativadas pela oxidação provocada por peróxido de hidrogênio. Foram analisadas as atividades das enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, glicose-6-fosfato desidrogenase e fosfoglicerato quinase - todas contendo grupos tiol passíveis de inativação quando oxidadas por peróxidos. Quando expostas ao peróxido de hidrogênio, o sistema tioredoxina foi capaz de reduzir as enzimas oxidadas, além de detoxificar o próprio peróxido de hidrogênio.

Embora Trx1 e Trx2 pareçam funcionar redundantemente como antioxidantes, Trx2 aparentemente desempenha papel predominante. A deleção apenas de TRX2 resultou em mutantes com extrema sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando comparados às leveduras nativas (Kuge & Jones, 1994).

O papel diferencial entre as tioredoxinas pode ser consequência da regulação na expressão de Trx1 e de Trx2. Enquanto a síntese de Trx2 é induzida em resposta a condições de estresse oxidativo, a síntese de Trx1 permanece praticamente inalterada (Garrido & Grant, 2002). Em resposta a diferentes meios, Trx2 foi sintetizada similarmente à proteínas que participam da resposta ao estresse oxidativo, como as peroxirredoxinas (peroxidases) Prx1 e Tsa2. Em contraste, a expressão de Trx1 foi parecida com a expressão das proteínas Vma5 e Cdc10, que funcionam em outras vias (Gasch *et al.*, 2000).

A expressão dos genes TRX2 e TRR1 (que codifica a tioredoxina redutase) é induzida pelos fatores transcricionais Yap1 e Skn7 em resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kuge & Jones, 1994, Morgan *et al.*, 1997). Yap1 é um ativador transcricional que regula vários genes de resposta ao estresse oxidativo, incluindo TRX2.

Todas estas observações sugerem que as tiorredoxinas são necessárias para a manutenção da homeostase redox, além do combate ao estresse oxidativo; onde Trx1 atuaria principalmente no balanço redox, e Trx2 como antioxidante.

Tiorredoxinas eucarióticas já foram implicadas em várias funções fisiológicas, que incluem expressão genética, crescimento celular e apoptose. Em mamíferos, ativa o receptor interleucina-2, modula a atividade de ligação ao DNA de alguns fatores de transcrição, por exemplo, NF- $\kappa$ B, e estimula a proliferação de linfócitos e de uma variedade de células tumorais humanas (revisto por Pedrajas *et al.*, 1999).

A presença de transcritos em *F. pedrosoi* como prováveis homólogos à tiorredoxinas revela a existência de um mecanismo biológico do fungo importante para a manutenção do balanço redox celular, além de combater o estresse oxidativo ao ajudar na detoxificação de EROs. Estudos posteriores com mutantes de *F. pedrosoi* para as tiorredoxinas podem confirmar as funções homólogas às tiorredoxinas das proteínas cujos transcritos foram identificados neste trabalho.

**Tabela 6.** Sequências de cDNA de *F. pedrosoi* anotadas como proteínas envolvidas no ciclo do glioxalato pela análise de similaridade por Blastx. As sequências de *F. pedrosoi* foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados “*Non-redundant protein sequences*” (nr) do NCBI.

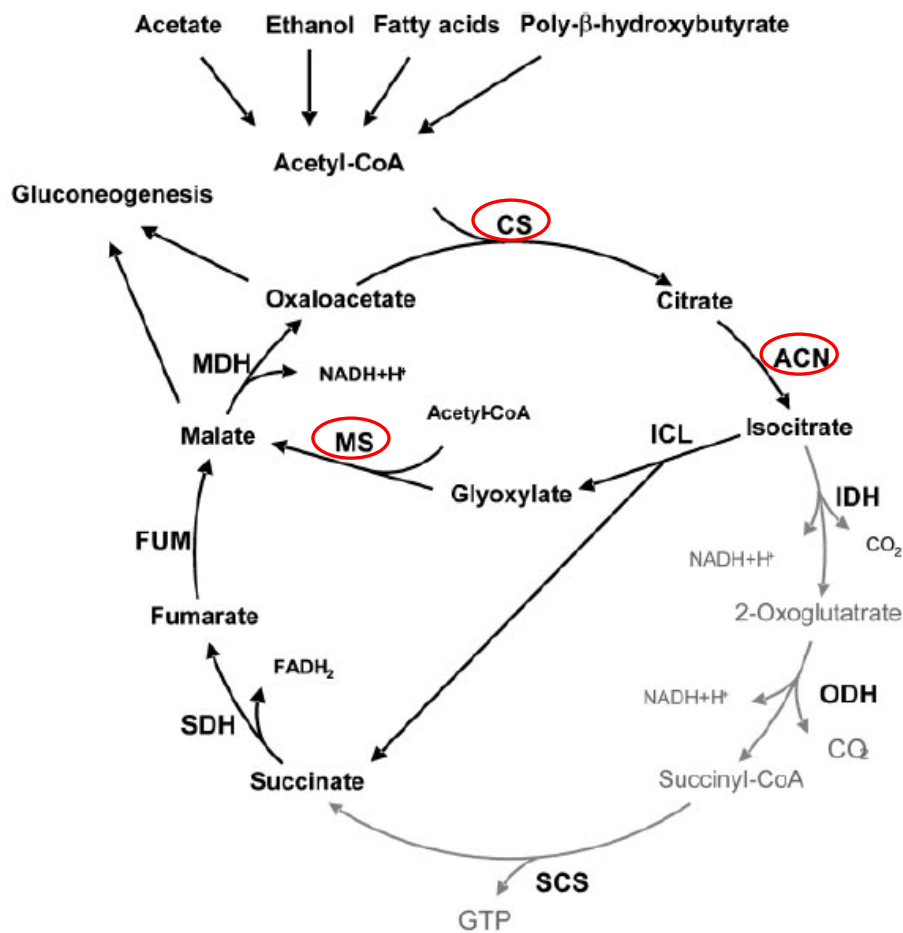
Sequência	Tamanho	Anotação Blastx	Cobertura	Identidade	E-value
A11(3)	582	- <a href="#">XP_002374915.1</a> : provável aconitase hidratase mitocondrial [ <i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357] (785aa)	70%	110/136 (81%)	1e-59
A05(2)	654 (1100)	- <a href="#">XP_003065533.1</a> : provável precursor de aconitase hidratase mitocondrial [ <i>Coccidioides posadasii</i> C735 delta SOWgp](784aa)	73%	111/145 (77%)	1e-56
A02(4)	556	- <a href="#">ref XP_003176169.1</a> 2- metilcitrato sintase [ <i>Arthroderma gypseum</i> CBS 118893] (469aa);	79%	114/148 (77%)	4e-63
		- <a href="#">gb EEH22113.1</a> citrato sintase [ <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb03] (469aa);	80%	110/149 (74%)	1e-59
		- <a href="#">gb EGA76402.1</a> Cit3p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Vin13] (486aa)	78%	79/147 (54%)	5e-40
G02(1)	498 (900)	- <a href="#">XP_001594153.1</a> : malato sintase [ <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980] (452aa)	68%	97/114 (86%)	1e-51

Os parâmetros das análises de similaridade por Blastx das sequências de *F. pedrosoi* (Sequência, Tamanho, Anotação, ...) são descritos na legenda da tabela 2.

A sequência G02(1) apresentou similaridade com a proteína malato sintase de *S. sclerotiorum* (XP\_001594153.1), com *E-value* de  $1e-51$ , cobertura de 68% e identidade de 86%. A malato sintase (mls), juntamente com a enzima isocitrato liase (icl), presentes nos glioxissomas, são enzimas chaves do ciclo do glioxalato. O ciclo do glioxalato é uma via metabólica alternativa para a biossíntese de carboidratos a partir de compostos de dois carbonos, como acetato e outros produtos da degradação de etanol, ácidos graxos e poli- $\beta$ -hidroxibutirato (Kornberg & Krebs, 1957; Kornberg & Madsen, 1957) (Figura 19). O ciclo do glioxalato consiste em um desvio, ou modificação, do ciclo do ácido cítrico (TCA), pois compartilha as mesmas reações iniciais da geração de citrato e isocitrato, mas ao invés de seguir as reações do ciclo do ácido cítrico que levam à oxidação completa dos compostos de carbono à  $CO_2$  para geração de energia, desvia para a formação de succinato e glioxalato. Succinato e glioxalato são gerados a partir da clivagem de isocitrato pela enzima isocitrato liase (icl) - a primeira enzima exclusiva do ciclo do glioxalato. A enzima malato sintase (mls) catalisa a etapa seguinte, de condensação de glioxalato com acetil-CoA, gerando malato. Malato e oxaloacetato podem ser convertidos em fosfoenolpiruvato, e este pode ser aproveitado na gliconeogênese. O succinato gerado no início do ciclo do glioxalato pode ser utilizado no ciclo do ácido cítrico para formar oxaloacetato. O resultado final do ciclo do glioxalato combinado com a via de gliconeogênese garante, portanto, a síntese de glicose a partir de compostos de dois carbonos, além de ser importante na reposição de compostos intermediários do ciclo do ácido cítrico, para geração de energia.

O ciclo do glioxalato está presente em vários organismos, sendo relatado em arqueas, bactérias, protistas, plantas, fungos e nematóides. Kondrashov *et al.*, (2006) em estudos genômicos comparativos revelou que em nematóides, os genes de isocitrato liase (ICL) e malato sintase (MS) são fusionados em um único gene bifuncional. O mesmo grupo descobriu que em mamíferos placentários, o gene MS é um pseudogene e o gene ICL está ausente. O grupo de pesquisadores sugere que os genes do ciclo do glioxalato apresentam uma variedade de eventos evolucionários, como transferência genética horizontal de bactérias para animais. A transferência genética horizontal entre bactérias e animais remete à teoria endossimbiótica que propõe o surgimento da célula eucariótica a partir da associação entre bactérias endossimbióticas. A endossimbiose implica que os eucariotos, constituídos de mitocôndrias ou

cloroplastos, seriam quimeras; formados pela combinação de diversos genomas de procariotos (Blanchard & Lynch, 2000).



**Figura 19.** Reações enzimáticas do ciclo do glioxalato e do ciclo do ácido cítrico (TCA). Abreviações: CS - citrato sintase; ACN - aconitase; IDH - isocitrato desidrogenase; ODH - 2-oxoglutarato desidrogenase; SCS - succinil-CoA sintase; SDH - succinato desidrogenase; FUM - fumarase; MDH - malato desidrogenase; MS - malato sintase; ICL - isocitrato liase. Os círculos em vermelho apontam as proteínas citrato sintase, malato sintase e aconitase cujos transcritos foram identificados em *F. pedrosoi* (Adaptado de Dunn *et al.*, 2009).

Estudos de regulação genética do ciclo do glioxalato revelaram que os genes de isocitrato liase (*icl*) e malato sintase (*mls*) são fatores essenciais para o crescimento de plantas e na patogencidade de bactérias e fungos de plantas, animais, e humanos (Lorenz & Fink, 2002; Vereecke *et al.*, 2002a, b). Na infecção por *M. tuberculosis*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. neoformans* e por *R. fascians*, a síntese de isocitrato liase e malato sintase favorece a partir de compostos simples de carbono a formação de polissacarídeos complexos, tais como celulose, glucanas e quitina – componentes fundamentais para sobrevivência e disseminação do patógeno dentro do hospedeiro.

Em *Magnaporthe grisea*, fungo patogênico de plantas que causa a doença chamada brusone em cereais, como arroz, trigo, centeio e cevada, a expressão de isocitrato liase (icl) é vantajosa para o fungo durante a infecção. *M. grisea*, capaz de reproduzir-se sexuada e assexuadamente, produz estruturas infecciosas específicas chamadas de apressórios. Os apressórios fixam-se na cutícula da planta, originando hifas; as hifas penetram na planta e disseminam-se rapidamente dentro do hospedeiro. Na infecção, isocitrato liase (icl) é expressa significativamente em conídios, apressórios, micélio e hifas do fungo. Foi observado que a deleção do gene ICL1 de *M. grisea* resultou na redução da formação de apressórios, na conidiogênese e na penetração da cutícula da planta, e conseqüentemente na diminuição de lesões nas folhas de arroz e cevada (Thines *et al.*, 2000). Mas o bloqueio de isocitrato liase não impediu completamente os esporos de germinar e de serem patogênicos; cerca de 30% dos esporos germinaram após 2h da infecção e eram patogênicos. Thienes *et al.* (2000) demonstraram em estudos anteriores que a germinação e crescimento desses mutantes não são completamente dependentes do catabolismo de lípidios e do ciclo do glioxalato; glicogênio pode ser a fonte de carbono armazenada que é catabolizada durante a germinação. Ainda assim, a expressão de isocitrato liase em *M. grisea* caracteriza-se como fator de virulência (Rauyaree *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003).

No fungo fitopatogênico *S. nodorum*, Solomon *et al.* (2004) caracterizaram e clonaram um gene que codifica malato sintase. Estudos da expressão do gene Mls1 revelaram altos níveis de transcritos em esporos não germinados, mas baixa atividade das enzimas malato sintase. Os estudos também revelaram que os níveis de transcritos de Mls1 diminuiriam cerca de 10 vezes na germinação, mas houve um aumento lento da transcrição no restante da infecção. Solomon *et al.* (2004) interromperam o gene Mls1 em *S. nodorum* por recombinação homóloga, e na ausência de qualquer fonte externa de carbono suplementada durante a infecção, os esporos mutantes de mls1 eram incapazes de germinar. A germinação e patogenese era restaurada pela adição de glicose ou sacarose; indicando que *S. nodorum* é dependente do catabolismo de lipídios e da ativação do ciclo do glioxalato para a infecção. Além disso, a análise de corpos lipídicos na linhagem mutante indicou a mobilização de lipídios; e a  $\beta$ -oxidação peroxissomal dos ácidos graxos era retardada ou inibida pela interrupção do ciclo do glioxilato. Este estudo demonstrou no fungo fitopatogênico a necessidade de malato

sintase para patogênese, sugerindo que a gliconeogênese é dependente do ciclo do glioxilato e necessária para a infecção. Durante as etapas iniciais da infecção, incluindo a germinação, o fungo depende do catabolismo de lipídios e da ativação do ciclo do glioxalato para a partir de fontes internas de carbono, armazenadas na forma de lipídios, sintetizar resíduos hexose para a biossíntese de nucleotídeos, parede celular e aminoácidos.

Em *P. brasiliensis*, fungo patogênico de humanos que causa a paracoccidiodomicose, o trabalho de Derengowski *et al.* (2008) revelou por análises de RT-PCR aumento nos níveis transcricionais dos genes ICL e MS do fungo em cultivo sem fontes complexas de carbono. Em meio de glicose, a expressão de ambos os genes permanecia em nível basal. No modelo de infecção do trabalho, em co-cultura com células peritonias de camundongos, as células leveduriformes após a fagocitose por macrófagos murinos apresentavam aumento significativo na expressão dos genes ICL e MS. O aumento das enzimas do ciclo do glioxalato sugere um possível mecanismo de adaptação do fungo em resposta ao ambiente interno do fagossomo, pobre em fontes complexas de carbonos, que permitiria a síntese de carboidratos a partir de compostos de dois carbonos.

Já foram relatados trabalhos semelhantes caracterizando o ciclo do glioxalato nos fungos patogênicos de humanos *Candida albicans* (Lorenz *et al.*, 2004) e *Penicillium marneffei* (Thirach *et al.*, 2008), e na bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (Dubnau *et al.*, 2002; Graham & Clark-Curtiss, 1999). Esses patógenos durante a infecção apresentaram aumento da expressão de ICL em resposta à fagocitose por macrófagos. Todos esses trabalhos reforçam a relevância do ciclo do glioxalato na virulência de fungos e bactérias em plantas, animais e humanos.

Como o ciclo do glioxalato é importante para vários patógenos, especialmente em fungos, as enzimas isocitrato liase (icl) e malato sintase (mls) são alvos promissores para drogas inibidoras específicas. A interrupção na expressão dos genes que codificam icl ou mls ou a inativação das enzimas bloquearia o ciclo do glioxalato, e conseqüentemente diminuiria drasticamente a patogênese desses organismos.

Até o presente momento ainda não existem estudos de expressão gênica dos genes de isocitrato liase e malato sintase em *F. pedrosoi*. Esses estudos irão permitir avaliar a importância do ciclo do glioxalato para o fungo durante a infecção. O sucesso da infecção/disseminação de *F. pedrosoi* dentro do hospedeiro depende da ativação do ciclo do glioxalato? Ou o fungo é capaz de utilizar outras vias metabólicas para a síntese dos carboidratos complexos independentemente da ativação do ciclo do glioxalato? Os trabalhos de expressão dos genes do ciclo do glioxalato poderão responder essas perguntas.



**Tabela 7.** Sequências de cDNA de *F. pedrosoi* anotadas como proteínas de choque térmico pela análise de similaridade por Blastx. As sequências de *F. pedrosoi* foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados “*Non-redundant protein sequences*” (nr) do NCBI.

Sequência	Tamanho	Anotação Blastx	Cobertura	Identidade	E-value
D06(3)	622	- <a href="#">EER43185.1</a> : chaperona molecular HSC82 dependente de ATP [ <i>Ajellomyces capsulatus</i> H143] (2445aa);	93%	103/216 (48%)	2e-37
		- <a href="#">EEH11149.1</a> : proteína de choque térmico [ <i>Ajellomyces capsulatus</i> G186AR] (1482aa)	93%	99/216 (46%)	2e-36
Contig8: D07(2), D10(3)	461	- <a href="#">XP_002479130.1</a> : provável proteína de choque térmico Hsp98/Hsp104/ClpA [ <i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500] (921aa)	65%	68/100 (68%)	2e-24
H05(1)	124 (1600)	- <a href="#">XP_001591945.1</a> : proteína de choque térmico Hsp90 [ <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980] (699aa)	99%	39/41 (96%)	2e-13
A03(2)	448 (1600)	- <a href="#">EFW15342.1</a> : proteína de choque térmico Hsp90 [ <i>Coccidioides posadasii</i> str. Silveira] (702aa)	91%	136/148 (92%)	8e-61
B10(2)	361 (300)	- <a href="#">XP_001260483.1</a> : proteína de choque térmico Hsp70 [ <i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181] (661aa)	40%	40/49 (82%)	1e-14
G03(3)	438	- <a href="#">AAQ83701.2</a> : proteína de choque térmico Hsp70 [ <i>Trichophyton verrucosum</i> ] (654aa)	36%	48/53 (91%)	5e-21
Contig10: D07(4), B03(5), C03(5)	992	- <a href="#">gb EFW20386.1</a> proteína de choque térmico Hsp30 [ <i>Coccidioides posadasii</i> str. Silveira] (202aa)	58%	78/195 (40%)	1e-26
		- <a href="#">ref XP_750539.1</a> proteína de choque térmico Hsp30 [ <i>Aspergillus fumigatus</i> Af293] (193aa)	53%	73/179 (41%)	3e-23
		- <a href="#">ref XP_963774.1</a> proteína de choque térmico Hsp30 [ <i>Neurospora crassa</i> OR74A] (228aa)	57%	75/200 (38%)	2e-19

Os parâmetros das análises de similaridade por Blastx das sequências de *F. pedrosoi* (Sequência, Tamanho, Anotação, ...) são descritos na legenda da tabela 2.

As proteínas de choque térmico (ou proteínas de estresse) são altamente conservadas e ubíquas, sendo encontradas em todos os organismos eucariotos e procariotos estudados, desde bactérias a humanos. Elas são classificadas em famílias, baseando-se no peso molecular aproximado de cada molécula e na homologia entre as sequências. Por exemplo, se uma *Hsp* tiver 30 kDa, sua família será a *Hsp30*. As principais famílias descritas são: *Hsp110*, *Hsp100*, *Hsp90*, *Hsp70*, *Hsp60*, *Hsp30* e *Hsp10*.

A partir da construção da biblioteca de cDNA de *F. pedrosoi* foram identificados transcritos do fungo que codificam, pela análise de similaridade, proteínas de choque térmico das famílias *Hsp100*, *Hsp90*, *Hsp70* e *Hsp30* (Tabela 7).

A sequência D06(3) de *F. pedrosoi*, de 622 nucleotídeos, apresentou similaridade com a chaperona molecular HSC82 dependente de ATP, de *A. capsulatus* (EER43185.1).

A *singlet* H05(1), de 124 nucleotídeos, apresentou similaridade com a proteína de choque térmico *Hsp90* de *S. sclerotiorum* (XP\_001591945.1).

A *singlet* A03(2), de 448 nucleotídeos, pela análise por Blastx foi anotada como a proteína de choque térmico *Hsp90*; com similaridade à *Hsp90* de *C. posadasii* (EFW15342.1).

A sequência B10(2) de *F. pedrosoi*, de 361 nucleotídeos, apresentou similaridade com a proteína de choque térmico *Hsp70* de *N. fischeri* (XP\_001260483.1).

A sequência G03(3), de 438 nucleotídeos, foi anotada como a proteína de choque térmico de 70 kDa; com similaridade à *Hsp70* de *T. verrucosum* (AAQ83701.2).

A *contig8* de *F. pedrosoi* foi anotada pela análise de similaridade por Blastx, como a proteína putativa de choque térmico da família *Hsp98/Hsp104/ClpA*.

A *contig10*, das sequências D07(4), B03(5) e C03(5), de 992 nucleotídeos, pela análise por Blastx foi anotada como proteína de choque térmico *Hsp30*, com similaridade à *Hsp30* de *C. posadasii* (gb|EFW20386.1|).

As proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins* ou *Hsp*) foram descobertas a partir de experimentos com larvas de *Drosophila melanogaster* expostas a altas temperaturas. Ritossa *et al.* (1962) verificaram que, em glândulas salivares de larvas da mosca, a expressão de alguns genes de cromossomos politênicos era induzida por choque térmico. Somente em 1974 os produtos gênicos destes genes induzidos pelo calor foram identificados, e essas proteínas foram denominadas “proteínas de choque térmico” (Tissières *et al.*, 1974). Trabalhos subsequentes revelaram que a síntese das proteínas de choque térmico também era induzida por estresse oxidativo, estresse nutricional, radiação UV, exposição a substâncias químicas (etanol, por exemplo), e infecções por bactérias e fungos patogênicos (revisito por Pockley, 2001). Por esse motivo, as proteínas de choque térmico também são chamadas de “proteínas de resposta ao estresse” (“stress proteins”).

A primeira função atribuída às proteínas de choque térmico foi a de proporcionar termotolerância ao organismo. Em 1985, Elizabeth Craig e Kurt Jacobsen realizaram mutações sítio-dirigidas nos genes YG101, YG103; YG100 e YG102 que codificavam a proteína de choque térmico Hsp70 de *S. cerevisiae*. Os pesquisadores verificaram que leveduras mutantes nos genes YG101 e YG103 tornaram-se sensíveis ao frio - cresciam bem a 37°C, mas não a 23°C. Leveduras com mutações nos genes YG100 e YG102, ao contrário, eram sensíveis ao calor – cresciam bem a 23°C, mas não a 37°C. Os pesquisadores sugeriram que os genes YG101 e YG103 estariam envolvidos na tolerância a temperaturas baixas, enquanto os genes YG100 e YG102 propiciariam tolerância às leveduras a temperaturas mais altas.

Apesar de muitas proteínas de choque térmico serem induzidas por estresse, muitas são expressas de modo constitutivo em células crescidas sob condições fisiológicas normais (Morimoto *et al.*, 1990). A expressão constitutiva de proteínas de choque térmico revelou novas e importantes funções biológicas.

Em 1991, Ellis e Van der Vies estenderam o conceito de chaperonas moleculares criado por Laskey *et al.* (1978), definindo uma classe muito maior de proteínas, incluindo as proteínas de choque térmico, cuja função seria a de permitir o dobramento

correto de outras proteínas. Embora Anfinsen (1973), por meio de experimentos *in vitro*, afirmasse que o processo de enovelamento de uma proteína é um processo espontâneo dirigido pela sequência linear de aminoácidos da cadeia polipeptídica, Hemmingsen *et al.* (1988) em experimentos *in vivo* observaram que o dobramento correto de uma proteína depende da participação de moléculas acessórias, as chamadas chaperonas. Ellis e Van der Vies (1991) descobriram que algumas proteínas de choque térmico - nem todas as Hsp - também atuam como chaperonas.

As chaperonas garantem o dobramento correto (dobramento nativo) de outras proteínas, pois diminuem a probabilidade de ocorrer interações incorretas que levariam a conformações incorretas das proteínas. Proteínas com dobramentos incorretos são proteínas inativas, incapazes de exercer a função padrão caso estivessem em seus dobramentos nativos. A sequência D06(3) de *F. pedrosoi* que apresentou similaridade com a chaperona molecular HSC82 dependente de ATP, de *A. capsulatus*, poderia por homologia auxiliar no dobramento correto de outras proteínas de *F. pedrosoi*.

Dobramentos incorretos de proteínas podem permitir interações novas e danosas entre diversas proteínas, originando aglomerados protéicos não funcionais. Se o aglomerado for muito grande, proteínas que atuam na degradação de proteínas não funcionais podem ser incapazes de desfazer o aglomerado, e, se o aglomerado aumentar ainda mais de tamanho, pode ocorrer morte celular.

Parsell *et al.* (1994) relataram que a proteína de choque térmico Hsp104 de *S. cerevisiae*, homóloga a ClpA de *E. coli*, confere às leveduras tolerância ao estresse térmico, auxiliando na proteólise de proteínas desnaturadas pelo calor. As Hsp104, assim como as Hsp70, atuam como chaperonas. O grupo de pesquisadores descobriu que a Hsp104 medeia a ressolubilização da proteína inativada a partir de agregados insolúveis. A *contig8* de *F. pedrosoi*, anotada como uma proteína putativa de choque térmico da família Hsp98/Hsp104/ClpA de *T. stipitatus*, poderia conferir ao fungo a ressolubilização de proteínas desnaturadas pelo estresse térmico.

As chaperonas e as proteínas de choque térmico atuam a partir do reconhecimento de características estruturais das superfícies de outras proteínas que

estão acessíveis durante o processo de montagem, ou que aparecem como resultado de estresse (como calor) em uma estrutura já montada da proteína - nesse caso, as chaperonas usam energia da hidrólise de ATP para desnovelar proteínas, possibilitando o enovelamento correto. Desse modo, as chaperonas, a partir de interações específicas, medeiam a montagem, estabilização e dobramento de proteínas, e, em alguns casos, a oligomerização e translocação de proteínas poliméricas, sem que sejam componentes finais das estruturas dessas outras proteínas (Gatenby & Ellis, 1990).

Algumas das proteínas de choque térmico em condições de estresse também estariam associadas à ubiquitina e ao proteassoma, mediando a degradação de proteínas danificadas. Pratt e Toft (2003) observaram que as Hsp90 e Hsp70 interagem com a proteína CHIP, uma ligase E3 ubiquitinada – que faz a ubiquitinação de cadeias polipeptídicas de proteínas alvo para degradação via proteassoma. As *singlets* H05(1) e A03(2) de *F. pedrosoi* foram anotadas como proteínas de choque térmico Hsp90, enquanto as sequências B10(2) e G03(3) apresentaram similaridade com a proteína de choque térmico Hsp70. *F. pedrosoi* teria assim o auxílio de Hsp70 e Hsp90 para degradar proteínas inativadas, e prevenir, portanto, a formação de agregados protéicos não-funcionais. Em *A. fumigatus*, as Hsp70 e Hsp90 também são descritas como proteínas alergênicas, comparando-se as sequências com alérgenos descritos na literatura (Bowyer & Denning, 2007).

A *contig10* de *F. pedrosoi* pela análise por Blastx foi anotada inicialmente como proteína de choque térmico Hsp30, baseado em sua similaridade com uma Hsp30 de *A. fumigatus*, com 53% cobertura, 41% identidade e *E-value* igual a  $3e-23$ . *A. fumigatus* é o agente etiológico mais comum da aspergilose invasiva (IA) em pacientes imunocomprometidos. Acredita-se que a patogênese de *A. fumigatus* esteja, dentre outros fatores, ligada à capacidade do fungo tolerar temperaturas altas, como a encontrada em hospedeiros humanos com febre (Albrecht *et al.*, 2010).

A *contig10* também obteve similaridade com outra Hsp30, desta vez com a de *N. crassa* (ref|XP\_963774.1). Plesofsky *et al.* (1999) revelaram que a interrupção do gene que codifica Hsp30 de *Neurospora crassa* causava defeitos na importação de proteínas

para a mitocôndria. Hsp30 de *Neurospora crassa* estaria envolvida, portanto, no transporte de proteínas para a mitocôndria.

Oglesbee *et al.* (2002) observaram a interação de Hsp murinos com proteínas do vírus sarampo. As Hsp fortaleceram o desenvolvimento das respostas imune e adaptativa do hospedeiro contra o agente infeccioso. Em células infectadas com o vírus, as Hsp eram expressas unicamente na superfície celular, onde eram alvo de linfócitos efetores. A necrose de células infectadas provocou a liberação de complexos de Hsp/proteínas virais, que foram reconhecidas pelas células apresentadoras de antígenos (APCs). O reconhecimento de APCs estimulou a maturação de novas células efectoras e a liberação de citocinas próinflamatórias, que tiveram efeitos adjuvantes na resposta imune adaptativa. Hsp participou de uma via alternativa da apresentação de antígeno imprescindível para a exposição prévia do patógeno a linfócitos T citotóxicos antes de uma infecção primária do vírus no cérebro. Partindo dessa idéia, o mesmo grupo de pesquisadores induziu choque térmico em camundongos com infecção persistente ao sarampo para estimular os níveis de Hsp no cérebro. Foi observado que Hsp participa na promoção de células efectoras para eliminação das partículas virais do sarampo no cérebro. Estas descobertas evidenciam a função de Hsp na imunidade contra o vírus do sarampo, sugerindo novos modelos tanto de intervenções terapêuticas como de medidas preventivas.

Vanittanakom *et al.* (2009) isolaram e expressaram um cDNA que codifica uma Hsp30 de *Penicillium marneffe* - fungo dimórfico que causa micose sistêmica, principalmente em pacientes imunocomprometidos. O grupo de pesquisadores analisou a expressão do gene HSP30 de *P. marneffe* em resposta ao aumento de temperatura. Foram detectados altos níveis dos transcritos de Hsp30 nas células leveduriformes crescidas a 37°C, enquanto foram baixos ou indetectáveis os níveis dos transcritos de Hsp30 em células miceliais a 25°C. A síntese de Hsp30 em resposta ao aumento de temperatura pode indicar um papel protetor da proteína ao estresse térmico, auxiliando na adaptação celular. Uma Hsp30 recombinante foi produzida e sua imunoreatividade foi testada contra soros de pacientes com AIDS infectados com *P. marneffe*. Resultados positivos de imunoblot contra algumas amostras de soros dos pacientes atestou o

caráter antigênico de Hsp30 de *P. marneffei* – indicando portanto, a capacidade de Hsp30 de *P. marneffei* provocar uma resposta imune em humanos.

Recentemente, Hsp de humanos, como Hsp60, Hsp70 e Hsp90 foram relatadas como importantes na ativação de linfócitos e macrófagos, e na ativação e maturação de células dendríticas (APCs) (Li *et al.*, 2002; Wallin *et al.*, 2002). Assim, as Hsps participariam ativamente entre os sistemas imune e adaptativo (Srivastava, 2002) e sua presença na circulação poderia indicar sinal de perigo ao sistema imune (Chen *et al.*, 1999; Kol *et al.*, 2000, Williams *et al.*, 2008).

O papel imunomodulador das proteínas de choque térmico poderia advir indiretamente da capacidade de atuarem como chaperonas – interagindo e transportando peptídeos variados. As Hsp, do tipo chaperonas, possuem domínios de ligação a peptídeos, que podem interagir com resíduos hidrofóbicos expostos de substratos protéicos. As Hsp60, Hsp70 e Hsp90 poderiam apresentar antígenos pela apresentação cruzada com peptídeos imunogênicos à moléculas MHC-I. Além de proteínas com resíduos hidrofóbicos, as Hsp ligam-se a moléculas não proteicas com resíduos hidrofóbicos expostos, incluindo lipídios baseados em ligantes de TLR (receptor do tipo Toll), como LPS (lipolissacarídeos, exemplo de ligante de TLR4) e lipoproteínas (ligante TLR2) (Calderwood *et al.*, 2007).

Consequentemente, Hsp podem-se ligar com moléculas associadas a patógenos, com resíduos hidrofóbicos expostos, como LPS, lipoproteínas e flagelinas. Essas moléculas patogênicas seriam responsáveis por provocar *in vitro* a liberação de citocinas, já que as Hsp, quando altamente purificadas, não provocaram a liberação de citocinas (Tsan & Gao, 2009).

A Hsp65, derivada de *Mycobacterium leprae*, é um importante imunomodulador. A Hsp65 foi testada na forma de vacinas de DNA (DNA-Hsp65) e foi capaz de conferir proteção aos animais infectados com *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania major* entre outros (Lowrie *et al.*, 1999; Coelho *et al.*, 2006; de Paula *et al.*, 2007). Ribeiro *et al.* (2010) testou com sucesso uma vacina de DNA-Hsp65 no tratamento de paracoccidiodomicose (PCM) experimental.

Isaque Siqueira, orientado pelo grupo da Dr.<sup>a</sup> Anamélia Bocca, em sua dissertação de mestrado, relatou o teste de uma vacina de DNA combinada com a Hsp65 de *M. leprae* (DNA-Hsp65) em um modelo murino para cromoblastomicose (CBM), com características semelhantes à CBM humana. A vacina de DNA-Hsp65 administrada por via intralesional, semelhantemente ao tratamento por itraconazol e anfotericina B (intervalos de 3 em 3 dias), foi eficiente no tratamento da CBM experimental, sugerindo uma alternativa de tratamento no combate a doença em humanos. A associação de quimioterápicos com a vacina de DNA-Hsp65 foi promissora no tratamento da CBM, diminuindo o tempo de tratamento da doença, e consequentemente os efeitos tóxicos inerentes da terapia.

Estudos futuros poderão avaliar a capacidade de imunomodulação de proteínas de choque térmico de *F. pedrosoi*. Alguma dessas Hsps com atividade chaperonítica associada a um adjuvante, LPS de *E. coli* por exemplo, poderiam incitar o sistema imune a reconhecer PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), e modular uma resposta imune específica no contexto de uma infecção. A construção e o teste de uma possível vacina de DNA-Hsp de *F. pedrosoi* em modelo murino com cromoblastomicose bem estabelecida pode revelar um tratamento alternativo e mais eficiente e sem a associação de quimioterápicos com efeitos colaterais severos ao paciente.



**Tabela 8.** Sequências de cDNA de *F. pedrosoi* anotadas como proteínas do metabolismo de carboidratos pela análise de similaridade por Blastx. As sequências de *F. pedrosoi* foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados “Non-redundant protein sequences” (nr) do NCBI.

Sequência	Tamanho	Anotação Blastx	Cobertura	Identidade	E-value
H03(1)	506	- <a href="#">XP_001936464.1</a> : acetoacetyl-CoA sintase [ <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP] (688aa)	52%	62/88 (71%)	1e-29
F01(3)	675	- <a href="#">EFV86858.1</a> : tartrato desidrogenase [ <i>Achromobacter xylosoxidans</i> C54] (358aa)	44%	96/99 (97%)	1e-51
A10(3)	520	- <a href="#">ZP_06295021.1</a> : succinato semialdeído desidrogenase [ <i>Burkholderia</i> sp. CCGE1001] (479aa)	96%	134/168 (80%)	6e-67
H04(1)	585 (1300)	- <a href="#">XP_001552341.1</a> : frutose-1,6-bifosfato [ <i>Botryotinia fuckeliana</i> B05.10] (343aa)	85%	138/166 (84%)	3e-76
H07(3)	400	- <a href="#">XP_002582722.1</a> : piruvato descarboxilase [ <i>Uncinocarpus reesii</i> 1704] (594aa)	97%	87/130 (67%)	3e-45
Contig13: A03(4), B12(4), D08(4), H10(4)	1141	- <a href="#">gb EER44445.1</a> gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase [ <i>Ajellomyces capsulatus</i> H143] (211aa)	53%	125/154 (81%)	1e-74
D06(5)	546	- <a href="#">ref XP_002148301.1</a> dihidrolipoamido desidrogenase [ <i>Penicillium marneffe</i> ATCC 18224] (510aa)	66%	102/121 (84%)	6e-49
		- <a href="#">ref NP_116635.1</a> Lpd1p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c] (499aa)	65%	87/119 (73%)	7e-39
F02(3)	637	- <a href="#">XP_002793894.1</a> : transaldolase [ <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb01] (324aa)	90%	165/194 (86%)	2e-83
E03(2)	543	- <a href="#">XP_750954.1</a> : provável subunidade da ATP citrato liase (Acl) [ <i>Aspergillus fumigatus</i> Af293] (486aa)	99%	143/180 (80%)	2e-81
Contig14: F10(3) G12(3)	396	- <a href="#">XP_001270284.1</a> : provável fumarato hidratase [ <i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1](543aa)	77%	83/102 (82%)	5e-37
Contig15: E07(3), B01(4), F03(4)	1130	- <a href="#">ref XP_002543340.1</a> inositolfosforilceramida-B C-26 hidroxilase [ <i>Uncinocarpus reesii</i> 1704] (372aa)	40%	96/153 (63%)	7e-48
H07(4)	789	- <a href="#">ref XP_002146289.1</a> provável enzima ramificadora de glicogênio GbeA [ <i>Penicillium marneffe</i> ATCC 18224] (685aa)	57%	66/118 (56%)	7e-42
A11(4)	763	- <a href="#">ref XP_002149464.1</a> provável vanilina desidrogenase [ <i>Penicillium marneffe</i> ATCC 18224] (483aa)	59%	95/151 (63%)	2e-50
H05(3)	489	- <a href="#">XP_003054123.1</a> : hidrolase glicosídica da família 13 [ <i>Nectria haematococca</i> ] (571aa)	69%	47/113 (42%)	1e-14

Os parâmetros das análises de similaridade por Blastx das sequências de *F. pedrosoi* (Sequência, Tamanho, Anotação, ...) são descritos na legenda da tabela 2.

A Tabela 8 evidencia a anotação de transcritos de *F. pedrosoi* em proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos. Estudos da expressão de compostos de açúcar de *F. pedrosoi* podem revelar a importância dos açúcares na sobrevivência do fungo durante a infecção ao hospedeiro. A adaptação ao ambiente pobre em nutrientes dos fagossomos exige que o fungo, para ser capaz de sobreviver e replicar-se dentro do hospedeiro, utilize estratégias bioquímicas alternativas e adaptáveis.

Tavares *et al.* (2007), em estudos de expressão gênica de *P. lutzii* fagocitados por macrófagos murinos peritoniais, revelaram que, após a internalização, os níveis de transcritos que codificam para proteínas relacionadas à glicólise eram reduzidos. A redução dos transcritos de glicólise pode ser explicada pela carência de glicose nos fagossomos. Já em condições que mimetizavam a via hematológica da disseminação do patógeno, não havia a repressão de genes da via glicolítica pelo fungo, pois o ambiente era rico em glicose.

Barbosa *et al.* (2006) revelaram em *P. brasiliensis* que a GAPDH, além de participar da via de glicólise do fungo, está associada à parede celular do fungo, e tem afinidade por laminina, fibronectina e colágeno do tipo I. Os experimentos de infecção *in vitro* mostraram a participação de GAPDH nos processos de adesão e internalização do fungo por pneumócitos humanos. A dissertação de mestrado de Adriane Alves de Oliveira revelou, na interação de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* com pneumócitos humanos, que GAPDH recebeu modulação positiva após 72 h de infecção, indicando, que a proteína provavelmente desempenha papel importante na paracoccidiodomicose (PCM).

A *contig13* de *F. pedrosoi* foi anotada pela análise por Blastx como a proteína gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH). Estudos da expressão de GAPDH em *F. pedrosoi* podem revelar papel homólogo da proteína à GAPDH de *P. lutzii* e de *P. brasiliensis*. A GAPDH de *F. pedrosoi* estaria, portanto, envolvida nos eventos de adesão e internalização do fungo durante a cromoblastomicose.

**Tabela 9.** Sequências de cDNA de *F. pedrosoi* anotadas como outras enzimas pela análise de similaridade por Blastx. As sequências de *F. pedrosoi* foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados “*Non-redundant protein sequences*” (nr) do NCBI.

Sequência	Tamanho	Anotação Blastx	Cobertura	Identidade	E-value
Contig19: G05(2), H12(2)	463	- <a href="#">XP_001559584.1</a> : peptidil-prolil cis-trans isomerase [ <i>Botryotinia fuckeliana</i> B05.10] (181aa)	94%	127/146 (87%)	5e-61
		- <a href="#">ref NP_010439.1</a> Cpr1p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c] (162aa)	91%	105/141 (74%)	1e-47
E04(3)	528	- <a href="#">XP_002848343.1</a> : proteína de membrana dedo de zinco DHHC [ <i>Arthroderma otae</i> CBS 113480] (488aa)	74%	70/131 (54%)	4e-32
A02(5)	864	<a href="#">ref XP_001260976.1</a> provável domínio da proteína dedo de zinco [ <i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181] (463aa)	62%	60/115 (52%)	6e-45
A02(2)	220	- <a href="#">XP_001932192.1</a> : fosfoquetolase [ <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP] (822aa)	99%	70/73 (96%)	5e-36
E11(3)	588	- <a href="#">XP_003196833.1</a> : provável fosfoquetolase [ <i>Cryptococcus gattii</i> WM276] (842aa)	48%	54/96 (57%)	9e-24
B11(3)	573	- <a href="#">EEQ91766.1</a> : fosfatidil sintase [ <i>Ajellomyces dermatitidis</i> ER-3] (438aa)	97%	137/187 (74%)	1e-77
B04(2)	535	- <a href="#">XP_002486627.1</a> : fosfatidil sintase [ <i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500] (459aa)	94%	127/177 (72%)	1e-61
D10(2)	256	- <a href="#">EFW16149.1</a> : subunidade da endonuclease de tRNA SEN2 [ <i>Coccidioides posadasii</i> str. Silveira] (473aa)	60%	33/52 (64%)	2e-13

Os parâmetros das análises de similaridade por Blastx das sequências de *F. pedrosoi* (Sequência, Tamanho, Anotação, ...) são descritos na legenda da tabela 2.

A *contig19* (Tabela 9) foi anotada como a proteína peptidil-prolil cis-trans isomerase, com similaridade com a peptidil de *Botryotinia fuckeliana* (XP\_001559584.1), com 94% de cobertura, 87% de identidade e *E-value* igual a 5e-61. A mesma *contig* apresentou similaridade com a proteína Crp1p de *S. cerevisiae* (ref|NP\_010439.1|), com 91% de cobertura, 74% de identidade e *E-value* igual a 1e-47. A Crp1 corresponde à proteína ciclofilina A peptidil-prolil isomerase. A Crp1p é altamente conservada desde eubactérias a mamíferos (Ansari *et al.*, 2002).

Ansari *et al.* (2002) selecionaram linhagens mutantes dependentes de Cpr1p. O grupo de pesquisadores revelou que todas as linhagens dependentes de Cpr1p possuíam mutações para o gene ZPR1 que codifica uma proteína dedo de zinco essencial. A dependência à Cpr1p era suprimida quando havia a superexpressão do fator traducional EF1 $\alpha$  (que se liga à proteína dedo de zinco Zpr1), de Cpr6p (ciclofilina 6, uma outra ciclofilina) ou de peptidil-prolil isomerase independente de Fpr1p. A supressão de ciclofilinas A em mutantes revelou a dependência das leveduras da atividade de peptidil-prolil isomerase de Crp1p. Estudos cinéticos de transportadores indicaram que a exportação ao núcleo de Zpr1p era deficiente em mutantes para Cpr1p, e a correção dessa deficiência estava correlacionada com a atividade de peptidil-prolil isomerase. Os resultados do grupo demonstraram, assim, interações funcionais entre Cpr1p, Zpr1p e EF1 $\alpha$ , onde Cpr1p atuaria na exportação de Zpr1p ao núcleo pela atividade de peptidil-prolil isomerase.

A presença de um transcrito de *F. pedrosoi* que possivelmente codifica uma peptidil-prolil isomerase sugere a existência de uma proteína de zinco essencial que precisa ser exportada ao núcleo, além de necessitar da isomerização *cis trans* na ligação peptidil-prolil.

Pelas análises por Blastx, as sequências E04(3) e A02(5) de *F. pedrosoi* apresentaram similaridade com proteínas contendo domínios de dedos de zinco. E04(3) foi similar à uma proteína dedo de zinco de membrana DHHC de *Arthroderma otae*. E A02(5) foi anotada como um domínio protéico dedo de zinco C2H2. Seria interessante verificar a possível interação da peptidil-prolil cis-trans isomerase com estas proteínas dedos de zinco, e os efeitos biológicos provocados em *F. pedrosoi*.

## 7. PRINCIPAIS RESULTADOS E CONCLUSÕES

A caracterização do transcrito parcial de *F. pedrosoi*, cultivado em meio Sabouraud líquido por 14 dias a 30°C e a 160 rpm, revelou a síntese de uma grande diversidade de transcritos, destacando-se pela análise de similaridade por Blastx, genes de proteínas transportadoras; de choque térmico; da respiração celular; do ciclo do glioxalato e de proteínas estruturais. A síntese desses transcritos revela possíveis mecanismos desenvolvidos por *F. pedrosoi* em resposta a condições de estresse nutricional, oxidativo, e térmico. Adicionalmente, algumas dessas proteínas poderiam atuar como fatores de virulência na infecção ao hospedeiro, como na cromoblastomicose.

A existência de sequências de *F. pedrosoi* que não apresentaram similaridade com sequências depositadas no banco de dados pelas análises por Blastx pode ser o indicativo de sequências específicas do fungo, e, conseqüentemente, de novas funções biológicas. A identificação futura dessas sequências poderá revelar mecanismos importantes, especialmente na patogênese e virulência do fungo.

A identificação dos transcritos de *F. pedrosoi* neste trabalho contribuiu para o conhecimento da biologia molecular do fungo. A partir da descoberta desses transcritos, podem ser realizados experimentos diversos visando à caracterização das proteínas, bem como à expressão e à regulação gênica. De posse de tais resultados, poderemos determinar os mecanismos envolvidos na patogênese de *F. pedrosoi*.

## 8. PERSPECTIVAS

- Continuar a caracterização do transcrito de *F. pedrosoi*;
- Obter sequências completas dos transcritos mais relevantes da biblioteca de *F. pedrosoi*;
- Estudar a expressão gênica desses transcritos simulando condições controle e de infecção;
- Construir e sequenciar uma nova biblioteca de *F. pedrosoi* na forma esclerótica. Os corpos escleróticos de *F. pedrosoi* seriam obtidos do cultivo do fungo em meio ácido, suplementado com propanolol (800 mM) ou fator de ativação plaquetária (PAF);
- Construir uma possível vacina de DNA-*Hsp* de *F. pedrosoi* em modelo murino de cromblastomicose;
- Caracterizar proteínas codificadas pelas sequências hipotéticas de *F. pedrosoi*.

## 9. ANEXOS

**Tabela 10.** Sequências de cDNA de *F. pedrosoi* anotadas como proteínas envolvidas na degradação de proteínas pela análise de similaridade por Blastx. As sequências de *F. pedrosoi* foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados “*Non-redundant protein sequences*” (nr) do NCBI.

Sequência	Tamanho	Anotação Blastx	Cobertura	Identidade	E-value
Contig12: B06(2), B10(4)	858	- <a href="#">gb EFY91215.1</a> ubiquitina [ <i>Metarhizium acridum</i> CQMa 102] (343aa)	79%	227/228 (99%)	1e-121
D05(1)	517	- <a href="#">XP_002625248.1</a> : enzima conjugada à ubiquitina [ <i>Ajellomyces dermatitidis</i> SLH14081] (246aa)	91%	117/158 (75%)	6e-64
F11(2)	425	- <a href="#">XP_003170734.1</a> : enzima conjugada à ubiquitina [ <i>Arthroderma gypseum</i> CBS 118893] (139aa)	81%	103/115 (90%)	2e-59
B07(4)	777	- <a href="#">gb EEQ88461.1</a> isopeptidase de ubiquitina associada a endossomo [ <i>Ajellomyces dermatitidis</i> ER-3] (553aa)	53%	95/125 (76%)	2e-53
		- <a href="#">gb EEH10795.1</a> similar à proteína de ligação à STAM [ <i>Ajellomyces capsulatus</i> G186AR] (551aa)	53%	92/125 (74%)	5e-52
C07(4)	653	- <a href="#">ref XP_001398113.1</a> dipeptidil-peptidase 5 [ <i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88] (732aa)	63%	82/121 (68%)	4e-45

Os parâmetros das análises de similaridade por Blastx das sequências de *F. pedrosoi* (Sequência, Tamanho, Anotação, ...) são descritos na legenda da tabela 2.

**Tabela 11.** Sequências de cDNA de *F. pedrosoi* anotadas como fatores de transcrição e tradução pela análise de similaridade por Blastx. As sequências de *F. pedrosoi* foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados “*Non-redundant protein sequences*” (nr) do NCBI.

Sequência	Tamanho	Anotação Blastx	Cobertura	Identidade	E-value
F07(1)	517	- <a href="#">XP_002374171.1</a> : provável regulador transcricional BDF1 [ <i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357](812aa)	65%	58/114 (51%)	1e-19
F09(1)	411 (1600)	- <a href="#">XP_003065138.1</a> : proteína da família NOT2/NOT3/NOT5 [ <i>Coccidioides posadasii</i> C735 delta SOWgp] (528aa)	67%	56/93 (61%)	4e-28
C04(2)	479	- <a href="#">XP_001594091.1</a> : fator de elongação 1-alfa [ <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980] (460aa)	39%	63/63 (100%)	2e-29
C08(2)	504	- <a href="#">XP_002487320.1</a> : provável subunidade do fator de elongação EF-2 [ <i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500] (843aa)	99%	154/167 (93%)	3e-85
C06(2)	1010	- <a href="#">XP_754715.1</a> : proteína regulatória SUAPRGA1 [ <i>Aspergillus fumigatus</i> Af293] (354aa)	61%	94/209 (45%)	6e-41
G08(2)	198 (1200)	- <a href="#">XP_001401364.2</a> : proteína regulatória de F1F0-ATP sintase Stf2 [ <i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88] (95aa)	92%	45/61 (74%)	2e-15

Os parâmetros das análises de similaridade por Blastx das sequências de *F. pedrosoi* (Sequência, Tamanho, Anotação, ...) são descritos na legenda da tabela 2.



**Tabela 12.** Sequências de cDNA de *F. pedrosoi* anotadas como proteínas do metabolismo de aminoácidos pela análise de similaridade por Blastx. As sequências de *F. pedrosoi* foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados “*Non-redundant protein sequences*” (nr) do NCBI.

Sequência	Tamanho	Anotação Blastx	Cobertura	Identidade	E-value
F11(3)	657	- <a href="#">EFX04019.1</a> : carboxipeptidase de serina [ <i>Grosmannia clavigera</i> kw1407] (612aa) Kex1p	82%	95/158 (61%)	1e-44
A10(3)	520	- <a href="#">ZP_06295021.1</a> : succinato semialdeído desidrogenase [ <i>Burkholderia sp.</i> CCGE1001] (479aa)	96%	134/168 (80%)	6e-67
D06(5)	546	- <a href="#">ref XP_002148301.1</a> dihidrolipoamido desidrogenase [ <i>Penicillium marneffe</i> i ATCC 18224] (510aa)	66%	102/121 (84%)	6e-49
		- <a href="#">ref NP_116635.1</a> Lpd1p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c] (499aa)	65%	87/119 (73%)	7e-39
F11(5)	653	- <a href="#">gb EGE79920.1</a> metiltransferase [ <i>Ajellomyces dermatitidis</i> ATCC 18188] (292aa)	83%	124/181 (69%)	3e-64
D04(2)	577	- <a href="#">XP_002627707.1</a> : aminotransferase [ <i>Ajellomyces dermatitidis</i> SLH14081] (481aa)	60%	60/123 (49%)	1e-16

Os parâmetros das análises de similaridade por Blastx das sequências de *F. pedrosoi* (Sequência, Tamanho, Anotação, ...) são descritos na legenda da tabela 2.

**Tabela 13.** Sequências de cDNA de *F. pedrosoi* anotadas como proteínas do metabolismo de lipídios pela análise de similaridade por Blastx. As sequências de *F. pedrosoi* foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados “*Non-redundant protein sequences*” (nr) do NCBI.

Sequência	Tamanho	Anotação Blastx	Cobertura	Identidade	E-value
F01(1)	480	- <a href="#">XP_002152724.1</a> : subunidade alfa da ácido graxo sintase FasA [ <i>Penicillium marneffe</i> ATCC 18224](1859aa)	73%	92/117 (79%)	1e-46
E03(5)	493	- <a href="#">ref XP_002622926.1</a> nitrorreductase [ <i>Ajellomyces dermatitidis</i> SLH14081] (222aa)	71%	71/117 (61%)	5e-37

Os parâmetros das análises de similaridade por Blastx das sequências de *F. pedrosoi* (Sequência, Tamanho, Anotação, ...) são descritos na legenda da tabela 2.

**Tabela 14.** Sequências de cDNA de *F. pedrosoi* anotadas como proteínas do metabolismo de vitaminas e cofatores pela análise de similaridade por Blastx. As sequências de *F. pedrosoi* foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados “*Non-redundant protein sequences*” (nr) do NCBI.

Sequência	Tamanho	Anotação Blastx	Cobertura	Identidade	E-value
A07(4)	847	- <a href="#">gb EEH20063.1</a> glutamil-tRNA sintetase [ <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb03] (671aa)	56%	81/145 (56%)	5e-36

Os parâmetros das análises de similaridade por Blastx das sequências de *F. pedrosoi* (Sequência, Tamanho, Anotação, ...) são descritos na legenda da tabela 2.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abliz P, Fukushima K, Takizawa K & Nishimura K.** (2004) Specific oligonucleotide primers for identification of *Cladophialophora carrionii*, a causative agent of chromoblastomycosis. *J Clin Microbiol*, 42: 404-407.
- Ahrens J, Graybill JR, Abishawl A, Tio FO & Rinaldi MG.** (1989) Experimental murine chromomycosis mimicking chronic progressive human disease. *Am J Trop Med Hyg*, 40: 651-658.
- Albrecht D, Guthke R, Brakhage A & Kniemeyer O.** (2010) Integrative analysis of the heat shock response in *Aspergillus fumigatus*. *BMC Genomics*, 11:32.
- Al-Hedaithy SS, Jamjoom ZA & Saeed ES.** (1988) Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Saudi Arabia. *APMIS*, 3: 94-100.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ.** (1990) "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol*, 215: 403-410.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zheng Z, Miller W & Lipman DJ.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25: 3389-3402.
- Alviano CS, Farbiarz SR, De Souza W, Angluster J & Travassos LR.** (1991) Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *J Gen Microbiol*, 137: 837-844.
- Alviano CS, Travassos LR, Angluster J & De Souza W.** (1992) Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. *Mycopathologia*, 119: 17-23.
- Alviano DS, Kneipp LF, Lopes AHCS, Travassos LR, Meyer-Fernandes JR, Rodrigues ML & Alviano CS.** (2003) Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic cells is induced by platelet-activating factor. *Res Microbiol*, 154: 689-695.
- Alviano DS, Franzen AJ, Travassos LR, Holandino C, Rozental S, Ejzemberg R, Alviano CS & Rodrigues ML.** (2004a) Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. *Infect Immun*, 72: 229-237.
- Alviano DS, Rodrigues ML, Almeida CA, Santos ALS, Couceiro JNSS, Soares RMA, Travassos LR & Alviano CS.** (2004b) Differential expression of sialylglycoconjugates and sialidase activity in distinct morphological stages of *Fonsecaea pedrosoi*. *Arch Microbiol*, 181: 278-286.
- Ansari H, Greco G & Luban J.** (2002) Cyclophilin A peptidyl-prolyl isomerase activity promotes Zpr1 nuclear export. *Mol Cell Biol*, 22(20): 6993-7003.

**Ameen M.** (2009) Chromoblastomycosis: clinical presentation and management. *Clin and Exper Dermatol*, 34: 849-854.

**Ammendola S, Pasquali P, Pistoia C, Petrucci P, Petrarca P, Rotilio G & Battistoni A.** (2007) High-affinity Zn<sup>2+</sup> uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella* entérica. *Infec Imm*, 75(12): 5867-5876.

**Andrade TS, Cury AE, de Castro LGM, Hirata MH & Hirata RDC.** (2007) Rapid identification of *Fonsecaea* by duplex polymerase chain reaction in isolates from patients with chromoblastomycosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 57: 267-272.

**Anfinsen CB.** (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181: 223-230.

**Baldwin SA.** (1993) Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1154: 17-49.

**Bansal AS & Prabhakar P.** (1989) Chromomycosis: a twenty-year analysis of histologically confirmed cases in Jamaica. *Trop Geogr Med*, 41: 222-226.

**Ben-Ami R, Lewis RE & Kontoyiannis DP.** (2010). Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection. *Br J Haematol*, 150 (4): 406-417.

**Blanchard JL & Lynch M.** (2000)"Organellar genes: why do they end up in the nucleus?" *Trends Genet*, 16 (7): 315-320.

**Bocca AL, Brito PPMS, Figueiredo F & Tosta CE.** (2006) Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Mycopathologia*, 161: 195-203.

**Bonifaz A, Martinez-Soto E, Carrasco-Gerard E & Peniche J.** (1997) Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole, cryosurgery and combination of both. *Int J Dermatol*, 36: 542-547.

**Bonifaz A, Carrasco-Gerard E & Saul A.** (2001) Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses*; 44: 1-7.

**Bowyer P & Denning DW.** (2007) Genomic analysis of allergen genes in *Aspergillus spp*: the relevance of genomics to everyday research. *Med Mycol*, 45:17-26.

**Brandt ME & Warnock DW.** (2003) Epidemiology, clinical manifestations, and therapy of infection caused by dematiaceous fungi. *J Chemother*, 15: 36-47.

**Bruckmann A, Künkel W, Härtl A, Wetzker R & Eck R.** (2000). A phosphatidylinositol 3-kinase of *Candida albicans* influences adhesion, filamentous growth, and virulence. *Microbiology*, 146: 2755–2764.

**Calderwood SK, Mambula SS, Gray Jr. PJ & Theriault JR.** (2007) Extracellular heat shock proteins in cell signaling. *FEBS Letters*, 581: 3689-3694.

**Calvin NM & Hanawalt PC.** (1988) High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol*, 107(6): 2796-2801.

**Carrion AL.** (1950) Chromoblastomycosis. *Annals of New York Accademy of Sciences*, 50:1255-1282.

**Castro LG, Pimentel ER & Lacaz CS.** (2003) Treatment of chromomycosis by cryosurgery with liquid nitrogen: 15 years' experience. *Int J Dermatol*, 42: 408-412.

**Chao W & Olson MS.** (1993) Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem J*, 292: 617-629.

**Chaudhuri M & Hill GC.** (1996) Cloning, sequencing, and functional activity of the *Trypanosoma brucei* alternative oxidase. *Mol Biochem Parasitol*, 83: 125-129.

**Coelho EA, Tavares CA, Lima K, Silva CL, Rodrigues JM & Fernandes AP.** (2006). Mycobacterium *hsp65* DNA entrapped into TDM-loaded PLGA microspheres induces protection in mice against *Leishmania* (*Leishmania*) *major* infection. *Parasitol Res*, 98 (6): 568-575.

**Cooper BH.** (1985) *Phialophora verrucosa* and other chromoblastomycoses fungi. In: Fungal Dimorphism with Emphasis of Fungi Pathogenic for Humans (Szaniszlo, P.J., Ed.), pp. 263-279, Plenum Press, New York.

**Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V & Kolb H.** (1999) Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J. Immunol.* 162: 3212–3219.

**Chouchane L, Bowers S, Sawasdikosol S, Simpson RM & Kindt TJ.** (1994) Heat shock proteins expressed on the surface of human T cell leukemia virus type I-infected cell lines induce autoantibodies in rabbits. *J Infect Dis*, 169: 253–259.

**Craig EA & Jacobsen K.** (1985) Mutations in cognate genes of *Saccharomyces cerevisiae* Hsp70 result in reduced growth rates at low temperatures. *Mol Cell Biol*, 5(12): 3517–3524.

**Cunha MM, Franzen AJ, Alviano DS, Zanardi E, Alviano CS, De Souza W & Rozental S.** (2005) Inhibition of melanin synthesis pathway by tricyclazole increases susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against mouse macrophages. *Microsc Res Tech*, 68: 377–384.

**Cunha MML, Franzen AJ, Seabra SH, Herbst MH, Vugman NV, Borba LP, de Souza W & Rozental S.** (2010) Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. *BMC Microbiology*, 10: 80.

**Dinant M, Baurain D & Matagne RF.** (1998) Characterization of a cDNA encoding the mitochondrial alternative oxidase (AOX) in *Chlamydomonas reinhardtii* and assays of

AOX inactivation by the antisense strategy. 441–444. In Moller IM, Giardstrom P, Glimelius K, Glaser E (ed.), *Plant mitochondria: from gene to function*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.

**De Oliveira AA.** (2010) 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 em Biologia Molecular, Universidade de Brasília.

**De Paula L, Silva CL, Carlos D, Matias-Pres C, Sorgi CA & Soares EG.** (2007) Comparison of different delivery systems of DNA vaccination of the induction of protection against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Genet Vaccines Ther*, 5:2.

**Dean M & R Allikmets.** (1995) Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev*, 5: 779–785.

**Derengowski LS, Tavares AH, Silva S, Procópio LS, Felipe MS & Silva-Pereira I.** (2008). Upregulation of glyoxylate cycle genes upon *Paracoccidioides brasiliensis* internalization by murine macrophages and in vitro nutritional stress condition. *Med Mycol*, 46: 125–134.

**Draculic T, Dawes IW & Grant CM.** (2000) A single glutaredoxin or thioredoxin is essential for viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 36: 1167–1174.

**Dubnau E, Fontán P, Manganeli R, Soares-Appel S & Smith I.** (2002). Mycobacterium tuberculosis genes induced during infection of human macrophages. *Infect Immun*, 70: 2787–2795.

**Dunn MF, Ramírez-Trujillo JA & Hernández-Lucas I.** (2009) Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis. *Microbiology*, 155: 3166–3175.

**Eck R, Bruckmann A, Wetzker R & Künkel W.** (2000). A phosphatidylinositol 3-kinase of *Candida albicans*: molecular cloning and characterization. *Yeast*, 16: 933–944.

**Ejiri SI, Weissbach H & Brot N.** (1979) Reduction of Methionine Sulfoxide to Methionine by *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 139: 161–164.

**Eide D.** (1997) Molecular biology of iron and zinc uptake in eukaryotes. *Cell Bio*, 9:573–577.

**Eide D.** (2009) Homeostatic and adaptive responses to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bio Chem*, 284(28): 18565–18569.

**Ellis DH & Griffiths DA.** (1974) The location and analysis of melanins in cell walls of some soil fungi. *Am J Microbiol*, 20: 1379–1428.

- Ellis RJ & Van der Vies SM.** (1991). Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.*, 60: 321–347.
- Elgart GW.** (1996) Chromoblastomycosis. *Dermatol Clin*, 14: 77–83.
- Esterre P, Peyrol S & Sainte-Marie D.** (1993) Granulomatous reaction and tissue remodelling in the cutaneous lesions of chromomycosis. *Pathol Res Pract*, 422: 285–291.
- Esterre P, Jahevitra M & Andriantsimahavandy A.** (2000) Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7: 497–500.
- Esterre P & Queiroz-Telles F.** (2006) Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. *Curr Opin Infect Dis*, 19: 148–152.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC & Green P.** (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res*, 8(3): 175-185.
- Farbiarz SR, De Carvalho TU, Alviano C & De Souza W.** (1990) Fine structure and cytochemistry of the interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and mouse resident macrophages. *J Med Vet Mycol*, 28: 373–383.
- Farbiarz SR, Carvalho TU, Alviano C & Souza W.** (1992) Inhibitory effect of melanin of the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cell *in vitro*. *J Med Vet Mycol*, 30: 265–73.
- Fath MJ & R Kolter.** (1993) ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev*, 57: 995–1017.
- Fernando MR, Nanri H, Yoshitake S, Ngata-Kuno K & Minakami S.** (1992) Thioredoxin regenerates proteins inactivated by oxidative stress in endothelial cells. *Eur J Biochem*, 209: 917–922.
- Fincato G, Polentarutti N, Sica A, Mantovani A & Collotti F.** (1991) Expression of a heat inducible gene of the Hsp70 family in human myelomonocytic cells: regulation by bacterial products and cytokines. *Blood*, 77: 579–586.
- Franke K, Nguyen M, Härlt A, Dahse HM, Vogl G, Würzner R, Zipfel PF, Künkel W & Eck R.** (2006) The vesicle transport protein Vac1p is required for virulence of *Candida albicans*. *Microbiology*, 152: 3111–3121.
- Franzen AJ, Cunha MM, Batista EJ, Seabra SH, De Souza W & Rozental S.** (2006) Effects of tricyclazole (5-methyl-1,2,4-triazol[3,4] benzothiazole), a specific DHN-melanin inhibitor, on the morphology of *Fonsecaea pedrosoi* conidia and sclerotic cells. *Microsc Res Tech*, 69: 729–737.
- Fridovich I.** (1978) The biology of oxygen radicals. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutases provide an important defense. *Science*, 201: 875–880.

- Fuchs J & Pecher S.** (1992) Partial suppression of cell mediated immunity in chromoblastomycosis. *Mycopathologia*, 119: 73–76.
- Fukushiro R.** (1983) Chromomycosis in Japan. *Int J Derm*, 22: 221–229.
- Gan ZR.** (1991) Yeast thioredoxin genes. *J Biol Chem*, 266: 1692–1696.
- Garrido EO & Grant CM.** (2002) Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. *Mol Micro*, 43(4): 993–1003.
- Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D & Brown PO.** (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*, 11: 4241–4257.
- Gatenby AA & Ellis RJ.** (1990) Chaperone function: The assembly of ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase. *Annu Rev Cell Biol*, 6: 125–149.
- Gibas C & Jambeck P.** (2001) *Developing Bioinformatics Computer Skills*. 1st ed. O'Reilly & Associates, Inc.
- Gimenes VMF, De Souza MG, Ferreira KS, Marques SG, Gonçalves AG, Santos DVCL, Silva CMP & Almeida SR.** (2005) Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. *Microbes Infect*, 7: 708–713.
- Gonzalez PP, Baldesten A & Reichard P.** (1970) The involvement of the thioredoxin system in the reduction of methionine sulfoxide and sulfate. *J Bio Chem*, 245: 2371–2374.
- Goswitz VC & Brooker RJ.** (1995) Structural features of the uniporter/symporter/antiporter superfamily. *Protein Sci*, 4: 534–537.
- Graham JE & Clark-Curtiss JE.** (1999). Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc Natl Acad Sci*, 96: 11554–11559.
- Grant SGN, Jessee J, Bloom FR & Hanahan D.** (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci*, 87: 4645–4649.
- Grant CM.** (2001) Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol Microbiol*, 39(3): 533–541.
- Griffith J, ME Baker, Rouch DA, Page MGP, Skurray RA, Paulsen IT, Chater KF, Baldwin SA & Henderson PJF.** (1992) Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons. *Curr Opin Cell Biol*, 4: 684–695.



**Guedes CS, Silva JP, Diniz JAP, Silva MB, Costa PF, Teixeira C & Salgado UI.** (2004) Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 46: 33–36.

**Günther J, Nguyen M, Härtl A, Künkel W, Zipfel PF & Eck R.** (2005). Generation and functional in vivo characterization of a lipid kinase defective phosphatidylinositol 3-kinase Vps34p of *Candida albicans*. *Microbiology*, 151: 81–89.

**Gupta AK, Taborda PR & Sanzovo AD.** (2002) Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. *Med Mycol*, 40: 529–534.

**Hamza SH, Mercado PJ, Skelton HG & Smith KJ.** (2003) An unusual dematiaceous fungal infection of the skin caused by *Fonsecaea pedrosoi*: a case report and review of the literature. *J Cutan Pathol*, 30: 340–343.

**Hayakawa M, Ghosn EB, Teixeira de Sousa MG, Ferreira KS & Almeida SR.** (2006) Phagocytosis, production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines by macrophages in the presence of dematiaceous fungi that causes chromoblastomycosis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 64: 382–387.

**Heby O.** (1981) Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Diff*, 19(1-3): 1–20.

**Hemmingsen SM, Woolford C, van der Vies SM, Tilly K, Dennis DT, Georgopoulos CP, Hendrix RW & Ellis RJ.** (1998) Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature*, 333: 330–334.

**Henderson PJF.** (1991) Sugar transport proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 1: 590–601.

**Hernández-Hernández F, de Bievre C, Camacho-Arroyo I, Cerbón MA, Dupont B & López-Martínez R.** (1995) Sex hormones effects on *Phialophora verrucosa* in vitro and characterization of progesterone receptors. *J Med Vet Mycol*, 33: 235–239.

**Higgins CF.** (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8: 67–113.

**Hira K, Yamada H, Takahashi YR & Ogawa H.** (2002) Successful treatment of chromoblastomycosis using carbon dioxide laser associated with topical heat applications. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 16: 273–275.

**Hoefnagel MHN, Millar AH, Wiskich JT & Day DA.** (1995) Cytochrome and alternative respiratory pathways compete for electrons in the presence of pyruvate in soybean mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 318: 394–400.

**Holmgren A.** (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem*, 264(24): 13963–13966.

**Holmgren A & Björnstedt M.** (1995) Thioredoxin and thioredoxin reductase, *Methods Enzymol*, 252: 199–208.

**Howard RJ, Ferrari MA, Roach DH & Money NP.** (1991). Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc Natl Acad Sci*, 88(24): 11281–11284.

**Huang X & Madan A.** (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res*, 9: 868–877.

**Hwang CS, Flaishman MA & Kolattukudy PE.** (1995) Cloning of a gene expressed during appressorium formation by *Colletotrichum gloeosporioides* and a marked decrease in virulence by disruption of this gene. *Plant Cell*, 7: 183–193.

**Ikuma H.** (1972) Electron transport in plant respiration. *Ann Rev Plant Physiol*, 23: 419–436.

**Ireland HE, Leoni F, Altaie O, Birch CS, Coleman RC, Hunter-Lavin C & Williams JHH.** (2007) Measuring the secretion of heat shock proteins from cells. *Methods*, 43: 176–183.

**Jarmuszkiewicz W, Sluse-Goffart CM, Hryniewiecka L, Michejda J & Sluse F.** Electron partitioning between the two branching quinol-oxidizing pathways in *Acanthamoeba castellanii* mitochondria during steady-state 3 respiration. *J Biol Chem*, 1998: 273: 10174–10180.

**Johnson CH, Prigge JT, Warren AD & McEwen JE.** (2003) Characterization of an alternative oxidase activity of *Histoplasma capsulatum*. *Yeast*, 20: 381–388.

**Joseph-Horne T, Hollomon DW & Wood PM.** (2001) Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Bio et Biophy Acta*, 1504: 179–195.

**Kirimura K, Yoda M & Usami S.** (1999) Cloning and expression of the cDNA encoding an alternative oxidase gene from *Aspergillus niger* WU-2223L. *Curr Genet*, 34: 472–477.

**Kneipp LF, Palmeira VF, Pinheiro AAS, Alviano CS, Rozental S, Travassos LR & Meyer-Fernandes JR.** (2003) Phosphatase activity on the cell wall of *Fonsecaea pedrosoi*. *Med Mycol*, 41: 469–477.

**Kneipp LF, Rodrigues ML, Holandino C, Esteves FF, Souto-Padrón T, Alviano CS, Travassos LR & Meyer-Fernandes JR.** (2004) Ecto-phosphatase activity in conidial forms of *Fonsecaea pedrosoi* is modulated by exogenous phosphate and influences fungal adhesion to mammalian cells. *Microbiology*, 150: 3355–3362.

**Kondo M, Hiruma M, Nishioka Y, Mayuzumi N, Mochida K, Ikeda S & Ogawa H.** (2005) A case of chromomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* and a review of reported cases of dematiaceous fungal infection in Japan. *Mycoses*, 48: 221–225.

- Kondrashov FA, Koonin EV, Morgunov IG, Finogenova TV & Kondrashova MN.** (2006) Evolution of glyoxylate cycle enzymes in Metazoa: evidence of multiple horizontal transfer events and pseudogene formation. *Biol Direct*, 1: 31.
- Kornberg HL & Krebs HA.** (1957) Synthesis of cell constituents from C2-units by a modified tricarboxylic acid cycle. *Nature*, 179: 988–991.
- Kornberg HL & Madsen NB.** (1957) Synthesis of C4-dicarboxylic acids from acetate by a glyoxylate bypass of the tricarboxylic acid cycle. *Biochim Biophys Acta*, 24, 651–653.
- Kwon-Chung KJ & Bennett JE.** (1992) Chromoblastomycosis. *Medical Mycology* (Cann C & Hunsberger S, eds), pp. 337–355.
- Kuan G, Dassa E, Saurin W, Hofnung M & Saier MH Jr.** (1995) Phylogenetic analyses of the ATP-binding constituents of bacterial extracytoplasmic receptor-dependent ABC-type nutrient uptake permeases. *Res Microbiol*, 146: 271–278.
- Kuge S. & Jones N.** (1994) YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J*, 13: 655–664.
- Lambers H.** (1982) Cyanide-resistant respiration: a non-phosphorylating electron transport pathway acting as an energy overflow. *Physiol Plant*, 55: 478–485.
- Lane CG.** (1915) A cutaneous disease caused by a new fungus *Phialophora verrucosa*. *J Cutan Dis*, 33, 840–846.
- Larone DH.** (1995) Medically Important Fungi - A Guide to Identification, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Laskey RA, Honda BM, Mills AD & Finch JT.** (1978). Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature*, 275: 416–420.
- Lathangue NB & Latchman DS.** (1988) A cellular protein related to heat shock protein 90 accumulates during herpes-simplex-virus infection and is overexpressed in transformed cells. *Exp Cell Res*, 178: 169–179.
- Laurent TC, Moore EC & Reichard P.** (1964) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *J Bio Chem*, 239(10): 3436–3444.
- Lessing F, Kniemeyer O, Wozniok I, Loeffler J, Kurzai O, Haertl A & Brakhage A.** (2007) The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. *Eukaryot Cell*, 6: 2290–2302.
- Limongi CL, Rozental S, Alviano CS & De Souza W.** (1997) The influence of surface carbohydrates on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with Chinese hamster ovary glycosylation mutant cells. *Mycopathologia*, 138: 127–135.

- Limongi CL, Alviano CS, De Souza W & Rozental S.** (2001) Isolation and partial characterization of an adhesion from *Fonsecaea pedrosoi*. *Med Mycol*, 39: 429–437.
- Limongi CL, De Souza W & Rozental S.** (2003) Protein kinase antagonists inhibit invasion of mammalian cells by *Fonsecaea pedrosoi*. *J Med Microbiol*, 52: 201–209.
- Li Q, Ritzel RG, McLean LLT, McIntosh L, Ko T, Bertran H & Nargang FE.** (1996) Cloning and analysis of the alternative oxidase gene of *Neurospora crassa*. *Genetics*, 142: 129–140.
- Li Z, Menoret A & Srivastava P.** (2002) Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr Opin Immunol*, 14: 45–51.
- Lopes AHCS, Dutra PML, Rodrigues CO, Soares MJ, Angluster J & Cordeiro RSB.** (1997) Effect of platelet-activating factor on the process of cellular differentiation of *Herpetomonas muscarum muscarum*. *J Eukaryot Microbiol*, 44: 321–325.
- Lopez Martinez R & Mendez Tovar LJ.** (2007) Chromoblastomycosis. *Clin Dermatol*, 25: 188–194.
- Lorenz MC & Fink GR.** (2002). Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryot Cell*, 1: 657–662.
- Lorenz MC, Bender JA & Fink GR.** (2004). Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot Cell*, 3: 1076-1087.
- Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, Lima VM, Facciolo LH, Stravropoulos E, Colston MJ, Hewinson RG & Silva CL.** (1999). Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature*, 100: 269–271.
- Lindquist S.** (1986) The heat-shock response. *Annu Rev Biochem*, 55: 1151–1191.
- Lupi O, Tying SK & McGinnis MR.** (2005) Tropical dermatology: fungal tropical diseases. *J Am Acad Dermatol*, 53: 931–951.
- MacDiarmid CW, Gaither LA & Eide D.** (2000) Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 19(12):2845–2855.
- Maxwell DP, Wang Y & McIntosh L.** (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc Natl Acad Sci*, 14: 8271–8276.
- McIntosh L.** (1994) Molecular biology of the alternative oxidase. *Plant Physiol*, 105: 781–786.
- Machida M, Asai K, Sano M, Takiara T, Kumagai T, Terai G, Kusumoto K, Arima T, Akita O, Kashiwagi Y, Abe K, Gomi K, Horiuchi H, Kitamoto K, Kobayahi T et al.** (2005)

Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 438 (7071): 1157–1161.

**Marger MD, & Saier MH Jr.** (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators catalyzing uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci*, 18: 13–20.

**Martínez RL & Tovar LJM.** (2007) Chromoblastomycosis. *Clinics in Dermatology* 25: 188–194.

**McCord JM, Keele BB Jr. & Fridovich I.** (1971) An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci*, 68: 1024–1027.

**McGinnis M.** (1983) Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis and mycology. *J Am Acad Dermatol*, 8: 1–16.

**Medlar EM.** (1915) A cutaneous infection caused by a new fungus *Phialophora verrucosa* with a study of the fungus. *J Med Res*, 32: 507–522.

**Mednick AJ, Nosanchuk JD & Casadevall A.** (2005) Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. *Infect Immun*, 73: 2012–2019.

**Mendes-Giannini MJS, Soares CP, Monteiro da Silva JL & Andreotti PF.** (2005) Interaction of pathogenic fungi with host-cells: molecular and cellular approaches. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 45: 383–394.

**Mendoza L, Karuppayil SM & Szaniszlo PJ.** (1993) Calcium regulates in vitro dimorphism in chromoblastomycotic fungi. *Mycoses*, 36: 157–164.

**Meuse BJD.** (1975) Thermogenic respiration in aroids. *Rev Plant Physiol*, 26: 117–126.

**Millenaar FF, Benschop JJ, Wagner AM & Lambers H.** (1998) The role of the alternative oxidase in stabilizing the in vivo reduction state of the ubiquinone pool and the activation state of the alternative oxidase. *Plant Physiol*. 118: 599–607.

**Minotto R, Verajao Bernardi CD, Mallmann LF, Albano Edelweiss I & Scroferneker ML.** (2001) Chromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *J Am Acad Dermatol*; 44: 585–592.

**Missall TA, Lodge JK & McEwen JE.** (2004) Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryot Cell*, 3: 835–846.

**Mitsui A, Hirakawa T & Yodoi J.** (1992) Reactive oxygen-reducing and protein-refolding activities of adult t cell leukemia-derived factor /human thioredoxin. *Biochem Biophys Res Commun*, 186: 1220–1226.

- Moore AL & Siedow JN.** (1991) The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1059(2): 121–140.
- Morimoto RI, Tissieres A, & Georgopoulos C.** (1990) Stress proteins in biology and medicine. *Cell*, 63: 865–866.
- Morimoto RI.** (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Develop*, 12: 3788–3796.
- Moore AL, Bonner WD & Rich PR.** (1978) The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 186: 298–306.
- Muller EGD.** (1991) Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *J Bio Chem*, 266: 9194–9202.
- Muller EGD.** (1994) Deoxyribonucleotides are maintained at normal levels in a yeast thioredoxin mutant defective in DNA synthesis. *J Biol Chem*, 269: 24466–24471.
- Muller EG.** (1996) A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Mol Biol Cell*, 7(11): 1805–1813.
- Niederhoffer EC, Naranjo CM, Bradley KL & Fee JA.** (1990) Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (sodA and sodB) genes by ferric uptake regulation (fur) locus. *J Bacter*, 172 (4): 1930–1938.
- Nobrega JP, Rosemberg S, Adami AM, Heins-Vaccari EM, Lacaz CS & De Brito T.** (2003) *Fonsecaea pedrosoi* cerebral phaeohyphomycosis (“chromoblastomycosis”): first human culture-proven case reported in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 45: 217–220.
- Nosanchuk JD & Casadevall A.** (2003) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol*, 5: 203–223.
- Nosanchuk JD & Casadevall A.** (2006) Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 3519–3528.
- Oberto-Perdigón L, Romero H, Pérez-Blanco M & Apitz- Castro R.** (2005) An ELISA test for the study of the therapeutic evolution of chromoblastomycosis by *Cladophialophora carrionii* in the endemic area of Falcon State, Venezuela [in Spanish]. *Rev Iberoam Micol*, 22: 39–43.
- Oglesbee MJ, Pratt M & Carsillo T.** (2002) Role for heat shock proteins in the immune response to measles virus infection. *Viral Immunol*, 15: 399–416.
- Osharov N & May GS.** (2001) The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiol Lett*, 199: 153–160.

**Palmer JM.** (1976) The organization and regulation of electron transport in plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Physiol*, 27: 133–157.

**Palmeira VF.** (2006) Peptidases secretadas por conídios de *Fonsecaea pedrosoi*: efeito de inibidores proteolíticos no crescimento, ultraestrutura e interação com hospedeiro. PhD Thesis, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil.

**Palmeira VF, Kneipp LF, Alviano CS & Santos ALS.** (2006a) Secretory aspartyl peptidase from mycelia of *Fonsecaea pedrosoi*: effect of HIV peptidase inhibitors. *Res Microbiol*, 157: 819–826.

**Palmeira VF, Kneipp LF, Alviano CS & Santos ALS.** (2006b) The major chromoblastomycosis fungal pathogen *Fonsecaea pedrosoi* extracellularly releases proteolytic enzymes whose expression is modulated by culture medium composition: implications on the fungal development and cleavage of key's host structures. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 46: 21–29.

**Pao SS, Paulsen IT & Saier MH.** (1998) Major Facilitator Superfamily. *Micro Mol Bio Rev*, 62: 1–34.

**Papa S & Skulachev VP.** (1997) Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem*, 174: 305–319.

**Parsell DA & Lindquist S.** (1993) The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Ann Rev Genetics*, 27: 437–496.

**Parsell DA, Kowal AS, Singer MA & Lindquist S.** (1994) Protein disaggregation mediated by heat shock protein Hsp104. *Nature*, 372(6505): 475–478.

**Paulsen IT, Sliwinski MK & Saier MH.** (2000) Microbial genome analyses: Global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. *J Mol Biol*, 301: 75–100.

**Paulsen IT, Beness AM & Saier MH.** (1997a) Computer-based analyses of the protein constituents of transport systems catalyzing export of complex carbohydrates in bacteria. *Microbiology*, 143: 2685–2699.

**Paulsen IT & Saier MH.** (1997b) A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J Membr Biol*, 156: 99–103.

**Pedrajas JR, Gavilanes F, Lopez-Barea J & Peinado J.** (1999). Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem Biol Interact*, 116: 1–17.

**Pedroso A & Gomes JM.** (1920) Sobre quatro casos de dermatite verrucosa produzida por *Phialophora verrucosa*. *An Paul Med Cir*, 11: 53–61.

- Pérez-Blanco M, Hernández RV, García-Humbría L & Yegres F.** (2006) Chromoblastomycosis in children and adolescents in the endemic area of the Falcón State, Venezuela. *Medical Mycology*, 44 (5): 467–471.
- Plesofsky N, Gardner N, Lill R & Brambl R.** (1999) Disruption of the gene for Hsp30, an alpha-crystallin-related heat shock protein of *Neurospora crassa*, causes defects in import of proteins into mitochondria. *Biol Chem*, 380: 1231–1236.
- Pockley AG.** (2001) Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? *Exp Rev Mol Med*, 21: 1–21.
- Poirriez J, Breuillard F, Francois N, Fruit J, Sendid B, Gross S & Dei-Cas E.** (2000) A case of chromomycosis treated by a combination of cryotherapy, shaving, oral 5-fluorocytosine, and oral amphotericin B. *Am J Trop Med Hyg*, 63: 61–63.
- Polla BS.** (1991) The heat shock response in human phagocytoses. *Immuno Lett*, 30(2): 159–163.
- Pratt WB & Toft DO.** (2003) Regulation of signaling protein function and trafficking by the Hsp90/Hsp70-based chaperone machinery. *Soc Exp Biol and Med*. 228: 111–133.
- Pretelt JM.** (1989) Cromomycosis. Aspectos epidemiológicos. Análisis de 82 casos estudiados en el Centro Dermatológico 'Ladislao de La Pascua' de 1956-1988. Dermatology Specialty Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Procópio LS.** (2006) Análise do transcriptoma parcial do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* recuperado após infecção de macrófagos peritoneais murinos. Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular, Universidade de Brasília.
- Queiroz-Telles F, Esterre P, Perez-Blanco M, Vitales RG, Salgado CG & Bonifaz A.** (2009) Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Medical Mycology*, 47(1): 3–15.
- Rajam MV & Galston AW.** (1985) The effects of some polyamine biosynthetic inhibitors on growth and morphology of phytopathogenic fungi. *Plant Cell Physiol*, 26: 683–692.
- Ramsay, LM & Gadd GM.** (1997) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function confirm a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification. *FEMS Microbiol Lett*, 152: 293–298.
- Rauyaree P, Choi W, Fang E, Blackmon B & Dean RA.** (2001). Genes expressed during early stages of rice infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Pathol*, 2: 347–354.
- Ribeiro EL, Soares AJ, Ferreira WM, Cardoso CG, Naves PLF & Dias SMS.** (2006) Cromoblastomycose: doença presente na realidade populacional brasileira. *RBAC*, 38(8): 189–192.



**Ribeiro AM, Bocca AL, Amaral AC, Souza AC, Faccioli LH, Coelho-Castelo AA, Figueiredo F, Silva CL & Felipe MS.** (2010) HSP65 DNA as therapeutic strategy to treat experimental paracoccidioidomycosis. *Vaccine*, 1528–1534.

**Richard-Blum S, Hartmann DJ & Esterre P.** (1998) Monitoring of extracellular matrix metabolism and cross-linking in tissue, serum and urine of patients with chromoblastomycosis, a chronic skin fibrosis. *Eur J Clin Invest*, 28: 748–754.

**Rippon JW.** (1988) Chromoblastomycosis. *Medical Mycology* (Sauders WB, ed), pp. 276–296.

**Ritossa FA.** (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18: 571–573.

**Robinson MJ, Osorio F, Rosas M, Freitas RP, Schweighoffer E, Gross O, Verbeek JS, Ruland J, Tybulewicz V, Brown GD, Moita LF, Taylor PR & Sousa CR.** (2009) Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *J Exp Med*, 206: 2037–2051.

**Rodrigues CO, Dutra PML, Souto-Padrón T, Cordeiro RSB & Lopes AHCS.** (1996) Effect of platelet-activating factor on cell differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun*, 223: 735–740.

**Rodrigues ML, Rozental S, Coceiro JNSS, Angluster J, Alviano CS & Travassos LR.** (1997) Identification of N-acetylneuraminic acid and its 9-O-acetylated derivative on the cell surface of *Cryptococcus neoformans*: influence on fungal phagocytosis. *Infect Immun*, 65: 4937–4942.

**Romani L.** (2004) Immunity to fungal infections. *Nature Reviews*, 4: 1–13.

**Rozental S, Alviano CS & de Souza W.** (1994) The *in vitro* susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. *Mycopathologia*, 126: 85–91.

**Rudolph M.** (1914) ber die brasilianische 'Figueira' (Vorläufige Mitteilung). *Archiv Schiffs und Tropen-Hyg*, 18: 498–499.

**Saberi H, Kashfi A, Hamidi S, Tabatabai SA & Mansouri P.** (2003) Cerebral phaeohyphomycosis masquerading as a parafalcian mass: case report. *Surg Neurol*, 60: 354–359.

**Sakajo S, Minagawa N & Yoshimoto A.** (1993) Characterization of the alternative oxidase protein in the yeast *Hansenula anomala*. *FEBS Lett*, 318: 310–312.

**Salgado CG, Silva JP, Picanço Diniz JA, Silva MB, Costa PF, Teixeira C & Salgado UI.** (2004) Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 46: 33–36.

**Sambrook J & Russel DW.** (2001) *Molecular cloning: A laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

**Santos ALS, Palmeira VF, Rozental S, Kneipp LF, Nimrichter L, Alviano DS, Rodrigues ML & Alviano CS.** (2007) Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. *FEMS Microbiol Rev*, 31: 570–591.

**Santosh V, Khanna N, Shankar SK, Pal L, Das S, Chandramukhi A & Kolluri VR.** (1995) Primary mycotic abscess of the brain caused by *Fonsecaea pedrosoi*. Case report. *J Neurosurg*, 82: 128–130.

**Schallreuter KU & Wood JM.** (1986) The role of thioredoxin reductase in the reduction of free radicals at the surface of the epidermis. *Biochem Biophys Res Commun*, 136: 630–637.

**Schell WA, McGinnis MR & Borelli D.** (1983) *Rhinocladiella aquaspersa*, a new combination for *Acrotheca aquaspersa*. *Mycotaxon*, 17: 341–348.

**Schauer R.** (1982) Chemistry, metabolism and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 40: 131–234.

**Schuber F.** (1989) Influence of polyamines on membrane function. *Biochem J*, 260: 1–10.

**Siedow JN & Umbach AL.** (2000) The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochim Biophys Acta*, 1459: 432–439.

**Silva M.** (1957) The parasitic phase of the fungi of chromoblastomycosis development of sclerotic cells *in vitro* and *in vivo*. *Mycologia*, 49: 318–331.

**Silva CL & Ekizlerian S.** (1985) Granulomatous reactions induced by lipids extracted from *Fonsecaea pedrosoi*, *F. compactum*, *Cladosporium carrionii* and *Phialophora verrucosum*. *J General Microbiol*, 131: 187–194.

**Silva JP, De Souza W & Rozental S.** (1999) Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic region (Brazil). *Mycopathologia*, 143: 171–175.

**Silva JP, Alviano DS, Alviano CS, De Souza W, Travassos LR, Diniz JAP & Rozental S.** (2002) Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained *in vivo* and *in vitro*: ultrastructure and antigenicity. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 33: 63–69.

**Silva MB, Marques AF, Nosanchuk JD, Casadervall A, Travassos LR & Taborda CP.** (2006) Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect*, 8: 197–205.

**Siqueira IM.** (2010) Avaliação do tratamento da cromoblastomicose experimental utilizando vacina de DNA (DNA-hsp65). Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular, Universidade de Brasília.

**Solomos T.** (1977) Cyanide-resistant respiration in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol*, 28: 279–297.

**Solomon PS, Tan KC, Sanchez P, Cooper RM & Oliver RP.** (2004) The disruption of a Ga subunit sheds new light on the pathogenicity of *Stagonospora nodorum* on wheat. *Mol Plant-Microbe Interact*, 17: 456–466.

**Sousa MG, Reid DM, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Ruland J, Langhorne J, Yamasaki S, Taylor PR, Almeida SR & Brown GD.** (2011) Restoration of Pattern Recognition Receptor Costimulation to Treat Chromoblastomycosis, a Chronic Fungal Infection of the Skin. *Cell Host & Microbe*, 9: 436–443.

**Souza ET, Silva-Filho FC, De Souza W, Alviano CS, Angluster J & Travassos LR.** (1986) Identification of sialic acids on the cell surface of hyphae and conidia of the human pathogen *Fonsecaea pedrosoi*. *J Med Vet Mycol*, 24: 145–153.

**Spector A, Yan GZ, ITuang RRC, McDermott MJ, Gascoyne PRC & Pigiet V.** (1988) The Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> upon Thioredoxin-enriched Lens Epithelial Cells. *J Biol Chem*, 263: 4984–4990.

**Srivastava P.** (2002) Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 2: 185–194.

**Szaniszlo PJ, Jacobs CW & Geis PA.** (1983) Dimorphism: morphological and biochemical aspects. *Fungi Pathogenic for Humans and Animals. Part A. Biology* (Howard DH, ed), pp. 323–426. Marcel Dekker, New York.

**Tang DJ, Li XJ, He YQ, Feng JX, Chen B & Tang JL.** (2005) The zinc uptake regulator Zur is essential for the full virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. *MPMI*, 18: 652–658.

**Takase T, Baba T & Uyeno K.** (1988) Chromomycosis. A case with a widespread rash, lymph node metastasis and multiple subcutaneous nodules. *Mycoses*; 31: 343–352.

**Tavares AH, Silva SS, Dantas A, Campos EG, Andrade RV, Maranhão AQ, Brígido MM, Passos-Silva DG, Facchin AL, Teixeira SM, Passos GA, Soares CM, Bocca AL, Carvalho MJ, Silva-Pereira I, Felipe MS.** (2007) Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbes Infect*, 9(5): 583–590.

**Teixeira de Sousa MG, Ghosn EEB & Almeida SR.** (2006) Absence of CD4<sup>+</sup> T Cells impairs host defence of mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. *Scand J Immunol*, 64: 595–600.

**Terra F, Torres M, da Fonseca O & Area Leao AE.** (1922) Novo typo de dermatite verrucosa mycose por *Acrotheca* com associação de leishmaniosa. *Bras Med*, 2: 368–378.

**Thines E, Weber RWS & Talbot NJ.** (2000) MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell*, 12: 1703-1718.

**Thirach S, Cooper CRJ & Vanittanakom N.** (2008). Molecular analysis of the *Penicillium marneffeii* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene (*gpdA*) and differential expression of *gpdA* and the isocitrate lyase-encoding gene (*acuD*) upon internalization by murine macrophages. *J Med Microbiol*, 57: 1322-1328.

**Tissi eres A, Mitchell HK & Tracy UM.** (1974) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol*, 84(3): 389-392.

**Touati D.** (1988) Molecular genetics of superoxide dismutases. *Free Rad Biol Med*, 5: 393-402.

**Trejos A.** (1954) *Cladosporium carrionii* n. sp. and the problem of Cladosporia isolated from chromoblastomycosis. *Rev Biol Trop*, 2:75-112.

**Tsan MF & Gao B.** (2009) Heat shock proteins and immune system. *J Leukocyte Biology*, 85: 905-910.

**Tsang ML & Schiff JA.** (1976) Sulfate-Reducing Pathway in *Escherichia coli* Involving Bound Intermediates. *J Bacteriol*, 125: 923-933.

**Tsuneto LT, Arce-Gomez B, Petzl-Erlor ML & Queiroz-Telles F.** (1989) HLA-A29 and genetic susceptibility to chromoblastomycosis. *J Med Vet Mycol*, 27: 181-185.

**Vallee BL & Falchuk KH.** (1993) The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol-Rev* 73: 79-118.

**van Burik JAH & Magee PT.** (2001) Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annu Rev Microbiol*, 55: 743-772.

**Vanittanakom N, Pongpom M, Praparattanapan J, Cooper CR & Sirisanthana T.** (2009) Isolation and expression of heat shock protein 30 gene from *Penicillium marneffeii*. *Med Mycol*, 47(5): 521-526.

**Vanlerberghe GC & McIntosh L.** (1997) Alternative oxidase. *Annu Ver Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48: 703-734.

**Vereecke D, Cornelis K, Temmerman W, Jaziri M, Van Montagu M, Holsters M & Goethals K.** (2002a). Chromosomal locus that affects pathogenicity of *Rhodococcus fascians*. *J Bacteriol*, 184: 1112-1120.

**Verstrepen KJ & Klis FM.** (2006) Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol*, 60: 5-15.

**Vereecke D, Cornelis K, Temmerman W, Holsters M & Goethals K.** (2002b). Versatile persistence pathways for pathogens of animals and plants. *Trends Microbiol*, 10: 485–488.

**Vidal M, Castro L, Cavalcante S & Lacaz C.** (2004) Highly specific and sensitive, immunoblotdetected 54 kDa antigen from *Fonsecaea pedrosoi*. *Med Mycol*, 42: 511-515.

**Wagner AM.** (1995) A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells. *FEBS Lett*, 368: 339-342

**Wallace HM, Fraser AV & Hughes A.** (2003) Review article: A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J*, 376: 1-14.

**Wallin RP, Lundqvist A, More SH, von Bonin A, Kiessling R & Ljunggren HG.** (2002) Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol*, 23: 130–135.

**Wang ZY, Thornton CR, Kershaw MJ, Debaio L & Talbot NJ.** (2003) The glyoxylate cycle is required for temporal regulation of virulence by the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Microbiol*, 47: 1601–1612.

**Weber GF.** (1922) II *Septoria* diseases of wheat. *Phytopathology*, 12: 537-585.

**Westwater C, Balish E & Schofield DA.** (2005) *Candida albicans*-conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. *Eukaryot Cell*, 4: 1654-1661.

**Welch WJ.** How cells respond to stress. (1993) *Scientific American*, 268: 56-64.

**Williams JH & Ireland HE.** (2008) Sensing danger-Hsp72 and HMGB1 as candidate signals. *J. Leukoc. Biol.* 83: 489–492.

[www.acervosaude.com.br/images/004.png](http://www.acervosaude.com.br/images/004.png) Complexos da ETC.

[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br) Censos demográficos de 2000 e de 2010.

[www.clcbio.com/index.php?id=995](http://www.clcbio.com/index.php?id=995) Bioinformatics explained: BLAST

**Zhao H & Eide D.** (1996a) The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci*, 93: 2454-2458.

**Zhao H & Eide D.** (1996b) The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bio Chem*, 38: 23203-23210.

**Zhao H & Eide D.** (1997) Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 17: 5044-5052.