

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

Especiação, genômica comparativa e reprodução sexuada no complexo de espécies do gênero *Paracoccidioides*.

Aluno: Marcus de Melo Teixeira

Orientadora: Maria Sueli Soares Felipe

Brasília - DF

Março/2012

**Especiação, genômica comparativa e reprodução
sexuada nos complexo de espécies do gênero
*Paracoccidioides***

**Tese de Doutorado desenvolvida
no Laboratório de Biologia
Molecular, UnB e apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
Biologia Molecular para obtenção
de título de Doutor em Biologia
Molecular.**

Orientado: Marcus de Melo Teixeira

Orientadora: Maria Sueli Soares Felipe

Brasília Março/2012

Índice:

Resumo.....	4
Summary.....	5
Capítulo I: Especiação no gênero <i>Paracoccidioides</i> : Estudos comparativos usando dados genômicos e morfológicos sustentam a proposição de uma nova espécie denominada <i>Paracoccidioides lutzii</i>	6
Introdução.....	7
Justificativa.....	18
Objetivos.....	19
Materiais e Métodos.....	19
Resultados e Discussão.....	23
Conclusão.....	36
Capítulo II: Análise genômica e morfológica sustentam a existência de ciclo sexual no gênero <i>Paracoccidioides</i>	38
Introdução.....	39
Justificativa.....	41
Objetivos	42
Materiais e Métodos.....	43
Resultados e Discussão.....	51
Conclusão.....	64
Referências Bibliográficas.....	65
Anexos.....	81

Resumo

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica que ocorre em vários países da América Latina, principalmente Brasil, Venezuela e Colômbia, afetando principalmente indivíduos da população rural. Por meio de estudos realizados nos campos da Biologia Molecular, Biologia Evolutiva e Ecologia no gênero *Paracoccidioides*, foi proposto neste trabalho uma nova espécie: *Paracoccidioides lutzii* sp. nov. Análises filogenéticas, estudos de genômica comparativa, análises de recombinação genética e análises morfológicas demonstram que *P. lutzii* representa uma linhagem altamente divergente monofileticamente separada de *P. brasiliensis*. *P. lutzii* é frequentemente encontrado nas regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil. Os estudos comparativos entre os genomas de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* revelaram uma alta divergência e diferenças significativas no tamanho do genoma, conteúdo gênico, elementos transponíveis, e repetições simples foram identificadas entre estas espécies. Estudos comparativos entre as espécies divergentes *P. brasiliensis* e *P. lutzii* geraram informações que podem ser utilizadas na clínica bem como no diagnóstico da PCM. Estudos de filogenia molecular indicaram que estas duas espécies de *Paracoccidioides* teriam um ciclo de vida sexuado devido à detecção de eventos de recombinação genética dentro destas populações. Estudos de genômica comparativa de todos os fungos dimórficos e patogênicos, usando como base os dados já classicamente descritos para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, revelaram a presença de genes relacionados à reprodução sexuada que incluem: o locus *MAT* e genes de receptores de feromônios, de feromônio- α , de enzimas de processamento de feromônios e reguladores de sinalização de resposta a feromônios. A expressão destes genes foi avaliada por PCR em tempo real em isolados de *Paracoccidioides* nas formas de micélio e levedura, demonstrando-se ter uma expressão preferencial na forma filamentosa, similar ao que já foi descrito para *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis*. Além disto, a expressão dos genes relacionados ao ciclo sexual teve um aumento significativo quando na presença de feromônios obtidos de sobrenadantes de co-cultura de isolados de tipos sexuais opostos. Cruzamentos de diferentes tipos sexuais, tanto de *P. brasiliensis* como de *P. lutzii*, possibilitaram a identificação de ascocarpos jovens com presença de hifas enoveladas e constritas, relacionadas ao estágio inicial do acasalamento em fungos "Pezizomycotina". Estes dados genômicos e morfológicos fortemente indicam a existência de ciclo sexual no gênero *Paracoccidioides*.

Summary

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis that occurs in several Latin American countries, mainly Brazil, Venezuela and Colombia, affecting mostly the rural population. Through studies in the fields of Molecular Biology, Evolutionary Biology and Ecology in the genus *Paracoccidioides*, it was proposed in this work a new species: *Paracoccidioides lutzii* sp. nov. Phylogenetic analyzes, comparative genomics, analysis of genetic recombination and morphological analysis showed that *P. lutzii* represents a separate species, highly divergent from *P. brasiliensis*. *P. lutzii* is often found in the midwest and north part of Brazil. Comparative genomics studies between *P. brasiliensis* and *P. lutzii* revealed a high divergence and differences in genome size, gene content, transposable elements and DNA repeats were identified between these species. Comparative studies between the diverging species *P. brasiliensis* and *P. lutzii* generated information that can be useful in the clinical diagnosis of PCM. Evolutionary studies suggested that these two species of *Paracoccidioides* have a sexual phase in its life cycle due detection of recombination events within these populations. Studies of comparative genomics of all dimorphic fungal pathogens, using classically described genes for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, revealed the presence of genes related to sexual reproduction that include: the *MAT* locus, pheromone receptors and genes encoding for α -pheromone, processing enzymes and regulatory pheromone response to pheromone signaling cascade. The expression of these genes has been evaluated by real time PCR of *Paracoccidioides* isolates in yeast and mycelial forms, showing an increased expression in the filamentous form, similar to what was already described for *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. Moreover, the expression of genes related to sexual cycle increased significantly after exposure of pheromone taken from co-culture supernatants of strains of opposite sex type. Sexual crosses between different mating types, of *P. brasiliensis* and *P. lutzii*, enabled the identification of young ascocarps with hyphae reeled and constricted, related to the initial stage of mating in Pezizomycotina fungi. These genomic and morphological data strongly indicate the existence of sexual cycle in the genus *Paracoccidioides*.

Capítulo 1: Especiação no gênero *Paracoccidioides*: Estudos comparativos usando dados genômicos e morfológicos sustentam a proposição de uma nova espécie denominada *Paracoccidioides lutzii*.

Introdução

O gênero *Paracoccidioides* pertence ao grupo dos fungos dimórficos patógenos humanos do filo Ascomycota

O reino Fungi é o maior e mais diverso dentre os organismos eucariotos. São membros funcionais dos ecossistemas terrestres sendo os principais degradadores de biomassa, atuando no ciclo do carbono, e estabelecendo uma importante relação com plantas e animais. Estudos mostram que mais de 70.000 espécies de fungos são conhecidas, entretanto estimativas apontam que existam em torno de 1.5 milhões de espécies (Hawksworth DL 2002; Lutzoni et al., 2004). Com os avanços das técnicas de biologia molecular, novos marcadores genéticos vêm sendo desenvolvidos com baixo custo de sequenciamento. Novos filios estão sendo propostos, remodelando a taxonomia dos fungos. Jones et al., (2011), por meio de dados de sequenciamento massivo de fungos de diversos ambientes, propuseram um novo filo para os fungos chamados de Cryptomycota, que conteria cerca de 50% da diversidade fúngica.

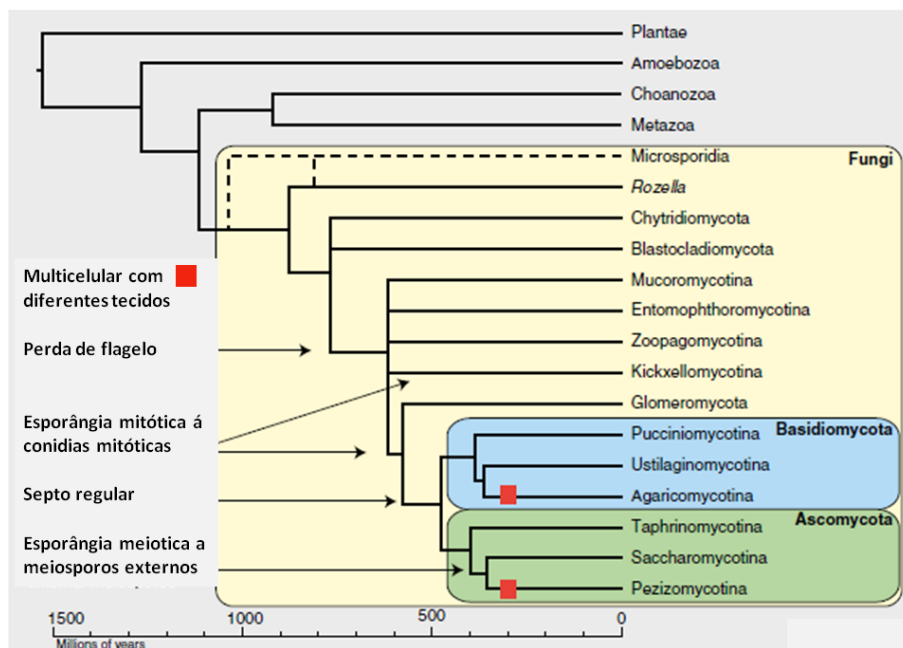


Figura 1. Representação filogenética dos fungos baseada em 199 táxons e 6 loci gênicos (James et al., 2006). Os tempos de divergência foram calibrados usando o programa r8s e considerando Paleopyrenomycites como ponto de calibração e membro de Ascomycota. As setas indicam as modificações morfológicas mais significativas observadas ao longo da evolução dos fungos como a perda de flagelo, esporângia mitótica á conídias mitóticas, septo regular, esporângia meiótica a meiosporos externos. Blocos vermelhos indicam os clados que possuem células multimórficas. O posicionamento entre Microsporídia e

Rozella não é bem resolvida filogeneticamente dentro dos fungos e os ramos estão destacados em pontilhados. Adaptado de Stajich et al., (2009).

Fungos são organismos heterotróficos, capazes de absorver moléculas simples e transformá-las em polímeros complexos como carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Possuem parede celular constituída por quitina, se apresentando na forma de bolores, cogumelos, líquens, ferrugem e leveduras, crescendo de forma unicelular ou multicelular. Fungos e animais são grandes e extensos clados descendentes de um ancestral unicelular que divergiu há cerca de 1 bilhão de anos (Taylor and Barbee, 2006; Stajich et al., 2009; Taylor & Barbee, 2010). A ordem exata da divergência em posições basais das árvores dos eucariotos é controversa. Estudos apontam que a linhagem que deu origem aos fungos podem ser dois grupos; a primeira terem sido originadas de amebas *nuclearioid* ou então dos grupos Microsporídia **(Figura 1)**.

Os dois filios mais recentes que apareceram na evolução dos fungos são Basidiomycota e Ascomycota. Estes dois filios constituem sub-reino Dikarya e abrigam cerca de 98% das diversidade dos fungos, sendo morfologicamente encontrados como hifas ou leveduras unicelulares, ou ambas. Na hifa, a mitose é acompanhada por uma formação de septo que se distribuem regularmente a cada evento de duplicação celular. Este é um importante evento evolutivo nos fungos multicelulares, pois os septos regulares possuem poros centrais que regulam a passagem de citoplasma e organelas. O nome Sub-reino Dikarya que contém os dois grandes filios Ascomycota e Basidiomycota ocorre pela exuberante forma de reprodução destes fungos: a fusão nuclear não ocorre mais pela interação direta de dois gametas, mas sim pela fusão de duas hifas parentais para formação de uma hifa binucleada (Dikaryon). Essa característica coloca um ponto central na evolução dos fungos, pois gerou um aumento dramático da diversidade na progênie recombinante. Nos filios de divergência tardia acima mencionados, o acasalamento estava restrito a um zigoto e um evento de meiose. Em Dikarya um evento de *mating* pode gerar milhões de eventos independentes de meiose (Gênero *Neurospora* e *Mycosphaerella*) ou então trilhões (Gênero *Calvatia*) nos zigotos produzidos. Isso permitiu aos fungos uma grande adaptação diversificada a diferentes ambientes e hospedeiros em variadas condições físico-químicas (Raju, 1980; Davis & Perkins, 2002; Stajich et al., 2009; Wittenberg et al., 2009). Desde a divisão estimada em 400 milhões de anos entre Basidiomycota e Ascomycota (Taylor and Barbee, 2006), mudanças drásticas no planeta fizeram com que os fungos adaptassem e desenvolvessem um sistema de sensoriamento e regulação a comportamentos ambientais específicos, induzindo respostas transcricionais e traducionais que pudessem promover a adaptação de "novas" condições ambientais. Tais mudanças climáticas ou ambientais promovidas pelo surgimento de

barreiras geográficas associadas à grande capacidade de gerar diversidade por meio de seu ciclo sexual modulam a grande diversidade genética nos fungos.

Fungos patogênicos humanos da família Ajellomycetaceae: Classificação filogenética e ciclo de vida.

Os membros da família Ajellomycetaceae são fungos de importância médica por serem patógenos de mamíferos e principalmente de seres humanos. Pertencem ao filo Ascomycota e por muitos anos foram considerados como membros da família polifilética Onygenaceae (Herr et al., 2001). Os membros da família Ajellomycetaceae se distinguem dos demais membros da família Onygenaceae por serem saprófitos ou viverem em associação a vertebrados. Mais tarde, estudos mostrando dados filogenéticos dos locus LSU e ITS revelaram que os anamorfos *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Emmonsia parva* e *Emmonsia crescens* constituíam um clado monofilético fortemente sustentado dentro da família Onygenaceae *stricto sensu* (Untereiner et al., 2004). Recentemente, estudos filogenéticos incluíram *Lacazia loboi*, fungo patogênico a humanos e golfinhos, como membro da família Ajellomycetaceae sendo espécie irmã do gênero *Paracoccidioides* (Teixeira et al., 2009; Vilela et al., 2009). Uma característica importante desta família, adquirida ao longo da evolução dos fungos, foi a dupla adaptação tanto a condições ambientais na forma saprófita, vivendo em competição com outros microrganismos no solo, como a sua infecção a hospedeiros humanos. Em temperatura ambiente (22-25 °C) estas espécies apresentam a forma miceliana, entretanto, durante a infecção em humanos ou em condições "*in vitro*", 35-37 °C, estas espécies se diferenciam em formas leveduriformes. Bagagli et al. (2006) consideram que o dimorfismo é uma "avenida aberta de duas vias", e que além de sua forma parasítica, o fungo deve retornar ao ambiente, contribuindo para preservar suas formas teleomórficas (ascósporos) e anamórficas (hifas ou conídias) em um definido e protegido habitat natural. As mudanças severas de temperatura, fontes de carbono, disponibilidade de íons metais e pH ocorrem de modo que os fungos alteram seu metabolismo e diversos trabalhos mostraram mudanças no perfil transcricional e proteico na diferenciação morfológica destas espécies (Felipe et al., 2005; Rappleye & Goldman, 2006; Klein & Tebbets, 2007; Silva et al., 2011). Além disto, alguns genes chaves desempenham um papel crucial no processo de transição morfológica de *H. capsulatum* e *B. dermatitidis*, como a proteína sensor/cinase; *drk1* (Nemecek et al., 2006), ou também como fatores transcricionais que atuam da manutenção da forma leveduriforme de *H. capsulatum*: *ryp1* (Nguyen & Sil, 2006), *ryp2* e *ryp3* (Webster & Sil, 2008). Além destes trabalhos, Paes et al., (2011) relataram que o fator de transcrição modulado por temperatura *Hsf* (Heat

Shock Factor) de *P. lutzii* é capaz de reconhecer elementos regulatórios dos genes *drk1* e *ryp1*, podendo atuar no dimorfismo.

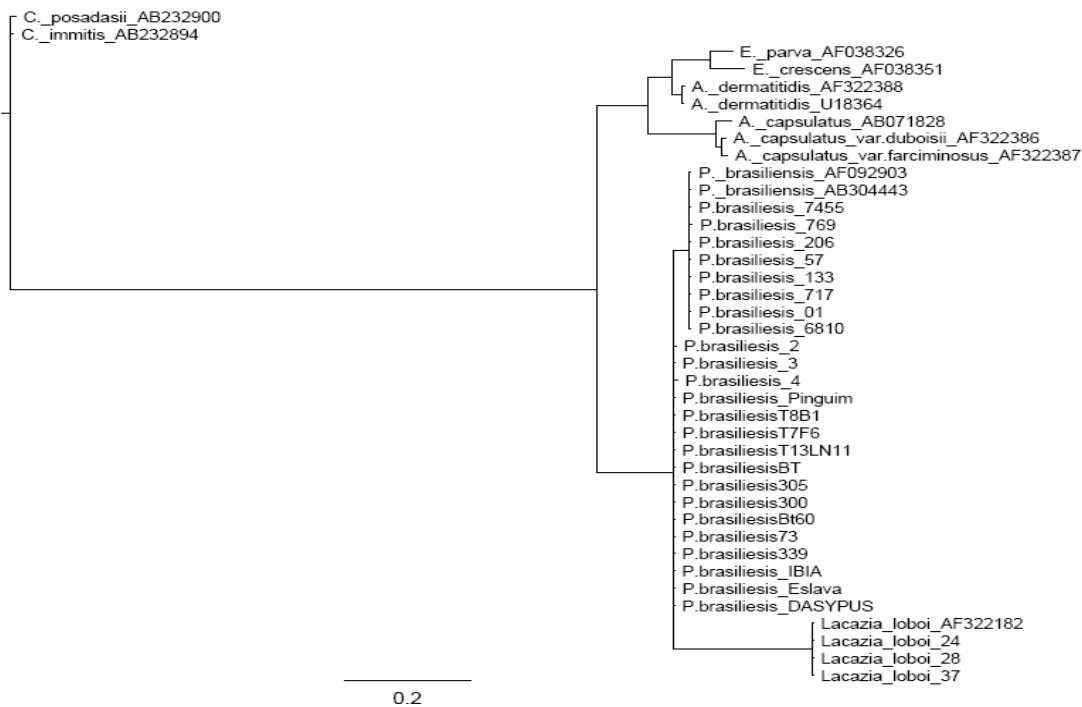


Figura 2: Distribuição filogenética das espécies constituintes da família Ajellomycetaceae, baseado na filogenia da região ITS + 5.8 S (Teixeira et al., 2009).

Especiação e distribuição geográfica dos fungos patogênicos da família Ajellomycetaceae

Os fungos dimórficos membros da família Ajellomycetaceae possuem uma distribuição global. Estima-se que sua radiação iniciou-se há 150 milhões de anos e estudos apontam uma longa co-existência e adaptação com hospedeiros mamíferos inclusive o *Homo sapiens*. Harrington & Rizzo. (1999) definem o método de reconhecimento de espécies filogenéticas como sendo "... *the smallest aggregation of populations with a common lineage that share a unique, diagnosable phenotypic characters*". O reconhecimento de espécies filogenéticas através da concordância genealógica (GCPSR - *Genealogical Concordance for Phylogenetic Species Recognition*) é bem aceito e se tornou muito comum entre os micologistas. Esta técnica oferece muitas vantagens para quem enfrenta problemas como populações morfológicamente homogêneas ou quando não há conhecimento suficiente a respeito da existência de reprodução sexuada do microrganismo (Taylor et al., 2000). De acordo com o método de GCPSR, diferentes *loci* gênicos apresentaram diferentes genealogias dentro da mesma espécie devido à existência do processo de recombinação gênica. Entretanto, entre duas espécies diversas as genealogias para os

diferentes *loci* serão concordantes devido aos processos de deriva e de isolamento genético (Taylor et al., 2000).

A classificação de uma nova espécie no grupo dos ascomicetos é baseada em características de reprodução sexual, e por isto espécies que se reproduzem somente assexuadamente têm sido problemáticas para serem integradas dentro da classificação deste filo. Esse sistema de classificação de fungos vem sendo complementado e aprimorado após o desenvolvimento de ferramentas moleculares, área esta denominada de filogenia molecular, onde espécies sexuadas ou assexuadas podem ser posicionadas em um sistema comum de classificação, baseado na comparação de sequências nucleotídicas distribuídas em seus genomas (Taylor, 1995; Taylor et al., 2000).

O patógeno dimórfico humano *Coccidioides immitis*, membro da família Onygenaceae *strictu sensu*, revelou um exemplo de especiação críptica. Análises filogenéticas de 12 *loci* nucleares (cinco propostos por Koufopanou et al., 1997 e sete por Fisher et al., 2000) de isolados de *C. immitis* coletados desde a Califórnia até a o norte da Argentina demonstraram um alto grau de isolamento genético. O status de nova espécie *Coccidioides posadasii* foi concedido ao grande grupo de isolados não-californianos devido ao cumprimento dos critérios de concordância entre as genealogias geradas a partir de *loci* únicos e não discordância entre os clados observados nas genealogias gênicas simples, quando comparado com a genealogia gerada pelos *loci* agrupados. O tempo do isolamento genético entre as duas espécies é muito longo variando de 11 – 12.8 milhões de anos atrás e essas são geograficamente distintas (Koufopanou et al., 1997; Fisher et al., 2000; Fisher et al., 2001; Fisher et al., 2002).

O fungo dimórfico patogênico *H. capsulatum* possui uma ampla distribuição geográfica abrangendo todos os continentes. Baseado em dados morfológicos, manifestações clínicas e distribuição geográfica o gênero *Histoplasma* consiste de três variedades *H. capsulatum* (Hc) var. *capsulatum*, *Hc* var. *duboisii* e *Hc* var. *farciminosum* (Rippon, 1988; Kwon-Chung & Bennett, 1992). Estudos de concordância genealógica de quatro regiões gênicas nucleares possibilitou observar a existência de oito clados geneticamente isolados (Kasuga et al., 1999), sendo sete deles consideradas espécies filogenéticas (Kasuga et al., 2003). Além disso, foi mostrado que o centro de dispersão do gênero *Histoplasma* se deu na América Latina e sua radiação começou num período de 3-13 milhões de anos atrás (Kasuga et al., 2003).

O outro membro de importância médica da família Ajellomycetacea é o gênero *Emmonsia*. *E. parva* foi considerada como única espécie por muito anos, entretanto por meio de estudos moleculares e morfológicos foi proposta uma nova espécie para o gênero: *E. crescens* diverge de *E. parva* pelo tamanho

dos diásporos, temperatura de crescimento, incompatibilidade em acasalamento e também por análises filogenéticas, sendo assim consideradas espécies diferentes (Sigler, 1996; Peterson & Sigler, 1998).

Embora o gênero *Blastomyces* contenha somente uma única espécie formalmente descrita, estudos filogenéticos utilizando 106 isolados clínicos e ambientais apontaram a existência de pelo menos 5 clados crípticos, sendo que 4 deles são fortemente sustentados pelos dados de filogenia molecular (Meece et al., 2010). Isso mostra a necessidade de se ampliar os estudos, uma vez que dados genômicos destes fungos já estão disponíveis tornando viável a busca de potentes marcadores moleculares.

De acordo com estudos filogenéticos da região ITS 1-2 + 5.8S utilizando todos os táxons da família Ajellomycetaceae e *Coccidioides* ssp. como *outgroup* dois grandes grupos foram formados, separando os gêneros *Paracoccidioides* e *Lacazia* de *Blastomyces*, *Histoplasma* e *Emmonsia* (**Figura 2**; Teixeira et al., 2009). O que chama atenção é o fato de o ciclo sexual ser claramente observado "*in vitro*" nas espécies de *B. dermatitidis*, *H. capsulatum*, *E. parva* e *E. crescens*, entretanto nunca foi observado em *P. brasiliensis*, *P. lutzii* ou mesmo em *L. loboi* sendo este, não cultivável até então (Teixeira et al., 2009; Theodoro et al., *in revision* PLoS ONE).

O gênero *Paracoccidioides* e a Paracoccidioidomicose (PCM).

As espécies *P. brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* sp nov. são agentes etiológicos da PCM, uma micose de perfil crônico que acomete tanto indivíduos imunocompetentes como imunossuprimidos. No Brasil a PCM é a micose sistêmica de maior incidência e os estados de São Paulo e Rondônia são considerados hiper endêmicos. *P. brasiliensis* está distribuído por toda América do Sul, sendo encontrado desde o sul do México até o Norte da Argentina (San-Blas et al., 2002). Já a recém proposta espécie *P. lutzii* até o momento, foi encontrada mais frequentemente na região centro norte do Brasil (estados de Goiás e Mato-Grosso). Casos isolados foram registrados em São Paulo e no Equador (Teixeira et al., 2009; Theodoro et al., *In revision*). *P. brasiliensis* é frequentemente isolado de tatus (*Dasypus novemcinctus* e *Cabassous centralis*) em áreas endêmicas e estes animais são considerados reservatórios naturais do fungo (Bagagli et al., 1998; Bagagli et al., 2003; Corredor et al., 2005). Os trabalhadores que manipulam diretamente o solo são os mais propensos a adquirir a PCM. Partículas micelianas do fungo ou conídias contidas em aerossóis podem ser inaladas e chegarem aos bronquíolos terminais dos pulmões. Uma vez instalado, o fungo detecta a diferença de temperatura e já nos alvéolos pulmonares começa o processo de transição dimórfica para levedura (San-Blas et al., 2002).

O estabelecimento da PCM, seus sintomas e severidade dependem de fatores intrínsecos do fungo como virulência e composição antigênica, e do hospedeiro no que diz respeito a sua eficiência de sua resposta imune (Mendes-Gianini et al., 2008; Calich et al., 2008). A infecção em humanos pode originar formas assintomáticas ou ativas da doença, causando infecção primária no tecido pulmonar podendo se disseminar para outros órgãos e tecidos. A PCM ocorre em indivíduos imuno-competentes e geralmente é mais frequente em homens. Existem duas principais formas da doença, a aguda ou subaguda (PCM juvenil) e a crônica (PCM adulta), entretanto a apresentação e o curso da doença variam caso a caso (Brummer *et al.*, 1993; Franco, 1994). A PCM crônica, que representa mais de 90% dos casos, ocorre majoritariamente em homens adultos, podendo levar de meses até anos para se instalar, afetando primariamente o epitélio pulmonar, causando problemas no funcionamento do pulmão. Subsequentemente, a doença pode disseminar para outros órgãos e tecidos, gerando lesões secundárias nas mucosas, pele, linfonodos, fígado, baço e glândulas adrenais. A forma juvenil da PCM é de evolução rápida (semanas a meses) sendo que a mais severa pode gerar taxa de mortalidade significativa por afetar o sistema reticuloendotelial e disfunção da medula-óssea. Independentemente do órgão envolvido, a PCM usualmente leva a formação de sequelas fibrosas, o que por muitas vezes incapacita o paciente de trabalhar.

O fungo apresenta uma complexa estrutura antigênica, expondo epítomos que são relacionados com a interação patógeno-hospedeiro e consequente virulência. O principal composto antigênico é uma glicoproteína imunodominante de 43 kDa presente na parede celular que se propõe estar associada com a virulência e/ou associada com um mecanismo de evasão aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Vicentini et al., 1994). Alguns mecanismos de imunidade inata estão envolvidos no combate inicial como, por exemplo, células NK, neutrófilos, monócitos e macrófagos (Calvi et al., 2003; Pagliari et al., 2010). A participação dessas células na reação inflamatória e atividade antifúngica é induzida pelo fungo e por citocinas produzidas pelas células durante sua interação com fagócitos. Algumas moléculas receptoras mostraram ser importantes no reconhecimento de *Paracoccidioides* como receptores *Toll-like* (TLRs), receptores de lectina (CLR) e mais recentemente as dectinas (McInturff et al., 2005). TLR2, TLR4 e dectina-1 são envolvidas no reconhecimento e internalização de *P. brasiliensis* com consequente ativação de neutrófilos. Isolados menos virulentos são preferencialmente reconhecidas por TLR2 e dectina-1 e consequente produção balanceada de TNF- α e IL-10, enquanto que cepas mais virulentas induzem a uma maior produção de TNF- α onde IL10 guaria uma resposta menos danosa e mais controlada (Bonfim et al., 2010). Estudos experimentais em pacientes com PCM indicaram que a resistência do fungo é dependente de células *T helper* e macrófago/monócitos, mediada pela produção de TNF- α e IFN- γ , sendo que o

sinergismo entre estas duas moléculas é essencial para resistência do hospedeiro. Durante o curso da infecção, linfócitos CD4 Th1 sintetizam citocinas como TNF- α , IFN- γ e IL-12, que protegem o hospedeiro prevenindo a dispersão do fungo. Pacientes com a doença ativa tem uma queda da reposta da imunidade celular, caracterizada pela queda de produção de citocinas do tipo Th1 como IFN- γ , IL-12 e IL-2 e um aumento de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10 representante de resposta do tipo Th2, não sendo esta resposta efetiva para o controle da doença (Bernard et al., 2001).

Com os avanços da biologia molecular, a variabilidade genética de *P. brasiliensis* foi mensurada por diversos marcadores moleculares como RAPD (Soares et al., 1995; Molinari-Madlum et al., 1999; Hahn et al., 2002; Hahn et al., 2003) RFLP (Nino-Vega et al., 2000) cariotipagem (Montoya et al., 1997; Montoya et al., 1999; Cano et al., 1998) microssatélite (Nascimento et al., 2004) e analisando polimorfismos de sequências gênicas (Matute et al., 2006, Carrero et al., 2008; Teixeira et al., 2009) demonstraram uma extensa variabilidade genética tanto entre isolados clínicos como ambientais de *P. brasiliensis*. Estes trabalhos mostraram correlação de grupos geneticamente isolados de *P. brasiliensis* com o isolamento geográfico (Nino-Vega et al., 2000; Teixeira et al., 2009), resistência a drogas (Hahn et al., 2003) e virulência (Molinari-Madlum et al., 1999). Estudos de filogenia molecular utilizando o sequenciamento de nucleotídeos de 8 loci gênicos de 65 isolados de *P. brasiliensis* revelaram a existência de pelo menos três espécies crípticas, filogenéticas distintas. Destas, duas delas são monofiléticas (PS2 - isolados do Brasil e Venezuela e PS3 – isolados da Colômbia) e uma espécie parafilética (S1), formada por isolados de maior abrangência geográfica; Brasil, Argentina, Peru, Paraguai e Venezuela (Matute et al., 2006).

Estudos filogenéticos analisando 21 isolados de *P. brasiliensis* (14 previamente identificados como S1 ou PS3 por Matute et al., 2006) em 21 loci polimórficos revelaram a existência de um isolado genotipicamente divergente que apresenta alta variabilidade genética quando comparado com os demais 20 isolados; isolado Pb01 (Carrero et al., 2008). O Pb01 se agrupa em um ramo a parte de todos isolados analisados - 19 loci contido nas três espécies filogenéticas descritas por Matute et al., (2006). Estes resultados levaram os grupos que trabalham com variabilidade genética e evolução deste patógeno a especularem se o isolado Pb01 poderia representar uma nova espécie filogenética. Porém, para que isso fosse válido deveria ser demonstrada a existência de outros isolados que se agrupam com o Pb01. Estudos anteriores utilizando a técnica de RAPD já indicavam que o isolado Pb01 se agrupava com outros isolados e que existia a possibilidade de encontrar outros indivíduos que compartilhassem o mesmo perfil genético (Soares et al., 1995; Molinari-Madlum et al., 1999). Durante os estudos de Carrero et al., (2008), um INDEL foi detectado no primeiro intron do gene *hsp70* exclusivo ao isolado Pb01. Isto possibilitou o desenho de

um primer exclusivo a essa região afim de identificar possíveis isolados que compartilhassem esta região com o isolado Pb01. Nesse sentido, Teixeira et al., (2009) analisaram 51 isolados previamente utilizados nos estudos de Soares et al., (1995); Molinari- Madlum et al.,(1999) Hahn et al., (2002); Hahn et al., (2003) com o marcador molecular específico *hsp70*, dezessete deles incluindo o Pb01 foram positivos para a reação de PCR mostrando a presença e compartilhamento do INDEL na região do *íntron 1* deste gene. Os 17 isolados que tiveram o fragmento de 400 pb amplificado foram intitulados "*Pb01 like*", sendo eles: Pb01, 3171, 6810, 7455, 769, 717, 133, RAJ-2, 189, 218, 206, 84, 61, 57, 694, 397, 351. Estes isolados denominados "*Pb01-like*" foram submetidos a amplificação de 13 *loci*: *gp43* Promotor-exon1, *gp43* exon2, Glucana Sintase exon2, Glucana Sintase exon 3, ARF-Fator de Ribosilação exons 2-3, Quitina sintase II Promotor-exon1, Quitina sintase II exons 2-4, α -tubulina (utilizados no trabalho de Matute et al., 2006) e Hidrofobina 5'UTR, Hidrofobina 3'-UTR, *hsp 70* 5'-UTR e *íntron1*, *kex íntron 2* e ITS1/2 (utilizados no trabalho de Carrero et al., 2008). Duas análises independentes foram realizadas afim de identificar a posição taxonômica proposta por Matute et al., (2006) e Carrero et al., (2008), na qual três espécies filogenéticas e um isolado atípico (Pb01) eram conhecidos. Em todos os 13 *loci* analisados, os isolados "*Pb01-like*" se mantinham separados por um ramo monofilético dos demais grupos que definem as três espécies filogenéticas descritas por Matute et al., (2006) (**Figura 3**) Teixeira et al., 2009. Além disso, os mesmo autores mostraram por meio de análises morfológicas que as conídias produzidas pelo isolado Pb01 (2-22 μ m) são mais alongadas que as produzidas por *P. brasiliensis* (2-5 μ M). Neste momento os autores sugeriram fortemente o estabelecimento da nova espécie *P. lutzii*.

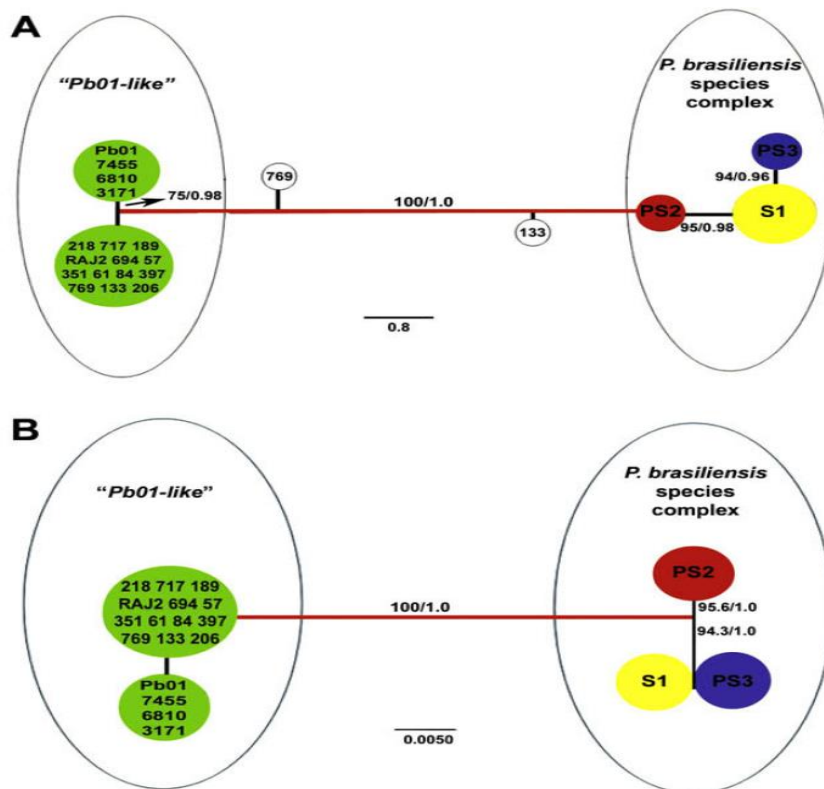


Figura 3. Análise filogenética gerada a partir de 8 *loci* concatenados de 3.565 nucleotídeos analisados e correspondentes ao conjunto 1 (*fks-E2*, *fks-E3*, *chs-E1*, *chs-E2* 4, *gp43-E1*, *gp43-E2*, *arf* e α -*tubulina*) e 1662 nucleotídeos correspondentes ao conjunto 2 hidrofobina-3' UTR, hidrofobina-5' UTR, hsp70-5'UTR e intron1, kex intron1 e ITS 1/2 + 5.8S. **A)** Árvore-consenso com raiz representando as relações filogenéticas dos isolados das 3 espécies filogenéticas descritas por Matute *et al.*, 2006 com os isolados membros do grupo "Pb01-like" representante do conjunto 1; **B)** Árvore-consenso sem raiz destacando a distância do ramo filogenético que separa as três espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* do grupo "Pb01-like" correspondente ao conjunto de dados 2. Os ramos filogenéticos com valores de *bootstrap* <70% e com valores de probabilidade posterior <0.95 (mais freqüentes dentro dos grupos S1 e PS2) (Teixeira *et al.*, 2009).

Em meados de 2008 os genomas de dois isolados de *P. brasiliensis* Pb18 (S1) e Pb03 (PS2) e um de *P. lutzii* (Pb01) foram disponibilizados pelo BROAD Institute em uma colaboração com diversos pesquisadores da América Latina. Nosso grupo de pesquisa foi incluído na rede o que possibilitou explorar em nível genômico as diferenças genéticas entre *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Nesse período, ou mesmo após a publicação de Teixeira *et al.*, (2009), alguns grupos revelaram por análises moleculares a grande diversidade genética entre *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Estudo realizado com a finalidade de caracterizar e avaliar a distribuição da Inteina PRP8 na população de *Paracoccidioides* revelou diferenças significativas entre o Isolado Pb01 e os demais isolados presentes nas espécies. Polimorfismos de base única (SNP's)

foram identificados sendo exclusivos do Pb01 (**Figura 4A**), e também as espécies crípticas de *P. brasiliensis*, sugerindo o PRP8 como um bom marcador filogenético para o gênero *Paracoccidioides* (Theodoro et al., 2008). A diversidade de DNA transposons foi explorada nos genomas de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb3) e também no genoma de *P. lutzii* revelando significativas diferenças na evolução dessa classe de elementos transponíveis. Oito novas famílias de elementos do tipo Tc1/mariner foram propostas e nomeadas de Trem (*Transposable element mariner*) e nomeados de A-H. De acordo com a **Figura 4B**, os elementos TremC e TremH estão presentes nos genomas de todas as espécies de *Paracoccidioides* sugerindo ter origem em um ancestral comum deste gênero. Podemos observar que além de TremC e TremH, *P. lutzii* possui apenas TremE, este exclusivo da espécie. Além disso, podemos notar que TremA, TremB e TremF pertencem ao ancestral comum das espécies filogenéticas de *P. brasiliensis*, entretanto observamos ainda que a espécie filogenética S1 abriga uma última família: TremD sendo esta específica deste clado. Estes resultados sugeriram que estes elementos Trem podem ter estado presentes no ancestral comum do gênero *Paracoccidioides* ou então evoluíram independentemente de forma que foram adquiridos por transferência horizontal, após a divergência entre *P. lutzii* e *P. brasiliensis* (Marini et al., 2010). Além disso, a diversidade genética de *P. lutzii* e *P. brasiliensis* foi também demonstrada em estudos filogenéticos utilizando cinco marcadores mitocondriais. As análises filogenéticas das 5 regiões independentes ou concatenadas (**Figura 4C**) mostraram novamente a excludente monofilia de *P. lutzii*, agora em um marcador não nuclear, o que mais uma vez fortalece a proposição de uma nova espécie (Salgado-Salazar et al., 2010). O estudo de maior representatividade filogenética realizados até hoje em fungos foi realizado por Wang et al., (2009). Neste trabalho foi avaliada a distribuição filogenômica de 82 fungos através do método de composição de vetor (*Composition Vector Method*). Neste estudo os autores puderam observar que *P. lutzii* (Pb01) e *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb3) constituíam monofilias independentes (**Figura 4D**), confirmando os dados recentemente publicados pelo nosso grupo e que constitui parte desta tese.

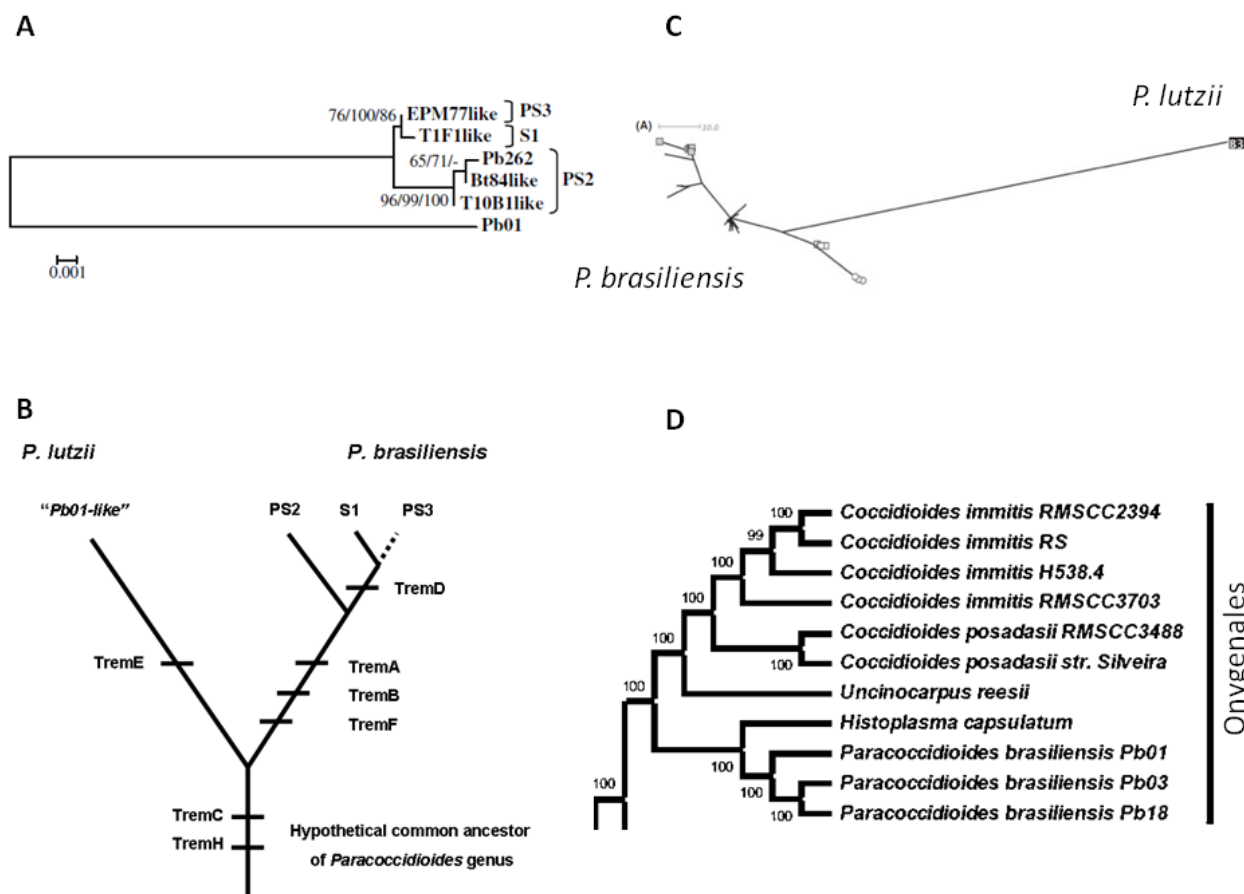


Figura 4. Estudos evolutivos envolvendo análises moleculares na população de *Paracoccidioides* revelam o alto grau de isolamento genético entre *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (A) Identificação de polimorfismos espécie-específica e filogenia do gene PRP8 (Theodoro et al., 2008). (B) A distribuição evolutiva de oito novas famílias de elementos do tipo Tc1/mariner mostrando uma distribuição espécie - específica, (Marini et al., 2010). (C) estudo filogenético utilizando cinco marcadores mitocondriais mostraram novamente a excludente monofilia de *P. lutzii* (Salgado-Salazar et al., 2010). (D) Estudos filogenômicos comparando os isolados Pb01, Pb18 e mostrando a exclusiva monofilia de *P. lutzii* (Wang et al., 2009). O presente trabalho visa formalmente descrever a nova espécie *P. lutzii*, por meio de análises filogenéticas e moleculares visando caracterizar novos isolados desta espécie.

Justificativa

A PCM é a micose sistêmica de maior relevância na América Latina que afeta principalmente a população rural no Brasil, Colômbia e Venezuela. O estabelecimento do perfil genotípico das espécies causadoras da PCM são de extrema importância para diagnóstico e podem refletir no tratamento da

doença. Este trabalho visa à identificação molecular e morfológica de isolados genotipicamente similares aos isolados "*Pb01-like*", visando definitivamente descrever a espécie *P. lutzii*. É sabido que estes isolados apresentam um genótipo diferente das três espécies crípticas descritas em *P. brasiliensis* (Matute et al., 2006, Carreiro et al., 2008; Teixeira et al., 2009). Este presente trabalho também mostra as principais diferenças em nível genômico encontradas entre *P. brasiliensis* e *P. lutzii*.

Diante deste cenário os estudos genômicos nas espécies de *Paracoccidioides* viabiliza o desenvolvimento de diagnóstico diferencial para estes grupos geneticamente distintos, além da grande contribuição aos estudos epidemiológicos, ecológicos e filogeográficos deste patógeno humano. Além disto, também possibilitam desenvolver novas drogas antifúngicas baseando-se no conhecimento biológico gerado pelo genoma do *P. brasiliensis* e *P. lutzii* e investigando a presença de possíveis alvos moleculares previamente estabelecidos.

Objetivo Geral

Expandir as análises de filogenia molecular e de morfologia de conídias utilizando novos isolados de *Paracoccidioides* de diferentes regiões geográficas do Brasil, bem como utilizar os dados de genômica estrutural para reforçar e propor uma nova espécie: *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.,

Objetivos específicos

- 1 - Identificar novos isolados genotipicamente iguais ao *P. lutzii* (isolados "*Pb01-like*") por análise filogenética dos loci *arf* e *gp43*;
- 2 - Caracterizar morfológicamente as conídias produzidas pelos recém identificados isolados de *P. lutzii* a fim de avaliar se existe um padrão compartilhado com o isolado *Pb01*;
- 3 - Identificar as principais diferenças genômicas entre os isolados de *P. brasiliensis* (*Pb18* e *Pb3*) e *P. lutzii* (*Pb01*), a fim de reforçar a proposição de uma nova espécie do gênero *Paracoccidioides*.

Materiais e Métodos

1) Cultivo e manutenção dos isolados de *Paracoccidioides*

Os isolados de *Paracoccidioides* utilizados neste trabalho foram mantidos na sua forma miceliana em meio Micosel (BBL), Sabouraud Dextrose Ágar (Acumedia) ou em Ágar Batata Dextrose (Acumedia), em estufa tipo BOD a temperatura de 24°C. Os isolados foram sub-cultivados a cada 30 dias. As cepas

utilizadas na forma leveduriforme foram mantidas em meio YPD ágar (1.0% extrato de levedura, 2.0% peptona, 1.5% ágar, 2.0% glicose) ou em meio Fava-Netto (0.3% protease peptona, 1% peptona, 0.5% de Extrato de carne, 0.5% NaCl, 4% Dextrose, 0.5% Extrato de levedura e 1.5% ágar), mantidos em estufa a 36°C e subcultivados a cada 10 dias.

2) Extração e quantificação de DNA

Colônias gigantes de micélio dos isolados de *Paracoccidioides* foram macerados em cadinho e pistilo com auxílio de nitrogênio líquido. O pó fino resultante do processo de maceração foi utilizado na extração de DNA de todos os isolados utilizando o kit DNeasy Plant DNA Extraction Mini Kit (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. Logo em seguida, a qualidade dos DNA's extraídos foi avaliada por eletroforese gel de agarose 0.8% pela sua integridade e também possível contaminação com RNA. Os DNA's extraídos foram quantificados e a sua pureza foi avaliada por espectrofotometria no aparelho NanoDrop 2000c (Thermo Scientific).

3) Reação de PCR para os loci *arf* e *gp43* de 13 isolados clínicos de *Paracoccidioides*.

As reações de PCR foram realizadas para os loci polimórficos *arf* e *gp43*, a fim de se identificar qual o genótipo dos 13 isolados clínicos de *Paracoccidioides* oriundos de Goiás, MATo-Grosso, MATo-Grosso do Sul e Rondônia (Tabela 1). Os *primers* utilizados para o locus *arf* foram (senso 5'TCTCATGGTTGGCCTCGATGCTGCC 3' e anti-senso 5' GAGCCTCGACGACACGGTCACGATC 3') e *gp43* (senso 5' TCGATGATCGACTTTCTCCTGATG 3' e anti-senso 5' TATTGCTGATCCTGCTTGAC 3'). As reações foram preparadas em volumes de 50µL, consistindo de 25 µL de Fidelity™ PCR Master Mix - 2X (USB®), 0,5 µM de cada oligonucleotídeo, 80ng de DNA genômico e água ultra-pura *q.s.p.* 50 µL. Os ciclos da PCR foram: Pré-desnaturação de 2 minutos a 94°C; amplificação em 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento (52 °C para o locus *arf* e 60 para o locus *gp43* °C) por 30 segundos e extensão final de 68°C por 1 minuto. Uma etapa de 5 minutos de extensão final a 68 °C foi adicionada ao final do ciclo. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0.8% e os produtos amplificados foram purificados com o kit *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare) e quantificados por espectrofotometria usando NANODROP 2000c (Thermo Scientific). Os segmentos amplificados foram sequenciados nas suas porções senso e anti-senso por eletroforese em capilar ABI 3130xl Prism utilizando o kit BigDye 3.1, de acordo com os protocolos do fabricante (ABI Foster City, CA).

Tabela 1. Dados de descrição, país e/ou estado de isolamento, fonte de isolamento, números de acesso do GENBANK e espécies dos isolados de *Paracoccidioides* utilizados para as análises filogenéticas dos loci *arf* e *gp43*.

Isolado	País e/ou estado de isolamento	Fonte	Numeros de acesso do locus <i>arf</i>	Numeros de acesso do locus <i>gp43</i>	Espécie Identificada
Pb01	Brasil, Goiás	Clínico	EU870317	EU870196	<i>P. lutzi</i> ^a
7455	Equador	Clínico	EU870325	EU870197	<i>P. lutzi</i> ^a
3171	-	Clínico	EU870321	EU870201	<i>P. lutzi</i> ^a
6810	-	Clínico	EU870318	EU870199	<i>P. lutzi</i> ^a
133	Brasil, Mato Grosso	Clínico	EU870323	EU870210	<i>Paracoccidioides</i> sp. ^a
84	Brasil, Mato Grosso	Clínico	EU870324	EU870198	<i>P. lutzi</i> ^a
769	Brasil, Roraima	Clínico	EU870332	EU870211	<i>Paracoccidioides</i> sp. ^a
717	Brasil, Mato Grosso	Clínico	EU870320	EU870200	<i>P. lutzi</i> ^a
RAJ2	Brasil, Mato Grosso	Clínico	EU870319	EU870208	<i>P. lutzi</i> ^a
189	Brasil, Mato Grosso	Clínico	EU870325	EU870203	<i>P. lutzi</i> ^a
61	Brasil, Mato Grosso	Clínico	EU870326	EU870206	<i>P. lutzi</i> ^a
206	Brasil, Mato Grosso	Clínico	EU870327	EU870202	<i>P. lutzi</i> ^a
694	Brasil, Mato Grosso	Clínico	EU870328	-	<i>P. lutzi</i> ^a
397	Brasil, Mato Grosso	Clínico	EU870329	EU870207	<i>P. lutzi</i> ^a
57	Brasil, Mato Grosso	Clínico	EU870330	EU870204	<i>P. lutzi</i> ^a
351	Brasil, Mato Grosso	Clínico	EU870331	EU870209	<i>P. lutzi</i> ^a
218	Brasil, Mato Grosso	Clínico	EU870333	EU870205	<i>P. lutzi</i> ^a
EE	Brasil, Mato Grosso	Clínico	JN680091	JN680103	<i>P. lutzi</i> ^a
JMS	Brasil, Mato Grosso	Clínico	JN680086	JN680097	<i>P. lutzi</i> ^a
JHS	Brasil, Mato Grosso	Clínico	JN680082	JN680095	<i>P. lutzi</i> ^a
MFC	Brasil, Mato Grosso	Clínico	JN680081	JN680094	<i>P. lutzi</i> ^a
PLRO1	Brasil, Rondônia	Clínico	JN680088	JN680099	<i>P. lutzi</i> ^a
ROSC	Brasil, Rondônia	Clínico	JN680087	JN680098	<i>P. lutzi</i> ^a
ED01	Brasil, Goiás	Clínico	JN680080	JN680092	<i>P. lutzi</i> ^a
1578	Brasil, Goiás	Clínico	JN680090	JN680101	<i>P. lutzi</i> ^a
8334	Brasil, Goiás	Clínico	JN680089	JN680100	<i>P. lutzi</i> ^a
5979	Brasil, Goiás	Clínico	JN680085	JN680096	<i>Paracoccidioides</i> sp.
MS1	Brasil, Mato Grosso do sul	Clínico	JN680083	JN680093	<i>Paracoccidioides</i> sp.

MS2	Brasil, Mato Grosso do sul	Clínico	JN680084	JN680102	<i>Paracoccidioides sp.</i>
C21	Colombia, Caldas	Armadillo	DQ004093	DQ003770	<i>P. brasiliensis-PS3^b</i>
C19	Colombia, Caldas	Armadillo	DQ004092	DQ003768	<i>P. brasiliensis-PS3^b</i>
C18	Colombia, Antioquia	Clínico	DQ004091	DQ003767	<i>P. brasiliensis-PS3^b</i>
B11	Brasil, Pará	Clínico	DQ004059	DQ003734	<i>P. brasiliensis-S1^b</i>
B10	Brasil, São Paulo	Armadillo	DQ004058	DQ003733	<i>P. brasiliensis-S1^b</i>
B9	Brasil, São Paulo	Armadillo	DQ004057	DQ003732	<i>P. brasiliensis-S1^b</i>
B15	Brasil, São Paulo	Clínico	DQ004063	DQ003738	<i>P. brasiliensis-PS2^b</i>
B13	Brasil, Minas Gerais	Ração de cachorro	DQ004061	DQ003736	<i>P. brasiliensis-PS2^b</i>
V2	Venezuela, Caracas	Clínico	DQ004095	DQ003772	<i>P. brasiliensis-PS2^b</i>
<i>L. loboi</i> 13FAV		Clínico	EU096458	EU109966	<i>L. loboi</i>

4) Análise Filogenética

Os fragmentos sequenciados em ambas as fitas foram utilizados somente aqueles com alta qualidade de eletroferograma, usando um padrão de exclusão de *phred*>30. As sequências foram inicialmente alinhadas utilizando o software BioEdit (Hall, 1999) através do algoritmo ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) e manualmente editadas para corrigir eventuais bases mal alinhadas. As sequências foram depositadas no GENBANK (ver números de acesso **Tabela 1**) e mediante a ferramenta de BLASTn, 17 isolados previamente caracterizados como *P. lutzii* foram incluídos no alinhamento. Além disso, três sequências de cada espécie filogenética de *P. brasiliensis* - S1, PS2 e PS3 e uma de *L. loboi* foram incluídas na análise (**Tabela 1**).

As análises filogenéticas foram realizadas pelos métodos de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood* - ML) conduzidas no software MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) e análises Bayesianas, implementado no software MrBayes v 3.1 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). O modelo de substituição de bases para cada locus individual foi inferido pelo software MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004) e os testes hierárquicos de razão de verossimilhança e os valores de AIC (*Akaike InforMATION Criterion*) para cada método de substituição de base foram calculados pelo software PAUP 4.0 (Swofford, 2003). Para o locus *arf* o modelo escolhido foi HKY (números de tipos de substituições = 2; razão transição/transversão = 1.3887; proporção assumida de sítios invariáveis = 0; taxas de frequências nucleotídicas iguais e sobre este modelo

de evolução de substituição de base, o valor de ML -lnL = 835.3787). Para o locus *gp43* o modelo escolhido foi K80 (numeros de tipos de substituições = 2; razão transição/transversão = 1.1013; proporção assumida de sítios invariáveis = 0; taxas de frequências nucleotídicas iguais e sobre este modelo de evolução de substituição de base, o valor de ML -lnL = 1066.3351).

As análises Bayesianas foram realizadas em 4 cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) e simuladas por 1.000.000 de gerações e as amostras foram coletadas a cada 1000 gerações. Os valores de *Log Likelihood* foram plotados contra o número da geração em que foi coletados visando identificar a fase estacionária em seguida as descartar (*burn-in*), ou seja valores não coletados nas fases de instabilidades das cadeias de Markov. Os pontos remanescentes foram usados para gerar a árvore consenso com valor de corte de 50% para ramos sustentados estatisticamente por valores de probabilidade posterior (Rannala & Yang, 1996). As análises de ML a árvore foram gerada através de buscas heurísticas e a árvore de maior valor de *Log Likelihood* foi escolhida. Os valores de *bootstrap* (Hillis & Bull, 1993) foram adicionadas ao ramos nos quais os táxons associados permaneceram agrupados. As árvores filogenéticas foram construídas com auxílio do software FigTree v1.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

5 - Análise morfológica de conídias dos isolados de *P. lutzii*

Os isolados PLRO1, ROSC, ED01 e 1578 foram mantidos a 25°C por 30-40 dias em estufa do tipo BOD e a morfologia das conídias foram avaliadas em dois tipos de técnica: Usando fita adesiva transparente (Durex, 3M), a qual foi tocada na superfície da colônia gigante de micélio ou então por microcultivo. Ambos os métodos usaram isolados cultivados em meio Ágar Batata Dextrose (Acumedia) ou Ágar Extrato de Solo (0.2% glicose, 0.1% extrato de levedura, 1.5% agar e 50% v/v extrato de solo, Kwong Chung, 1967), corados com lactofenol azul algodão previamente fixados em vapor de formaldeído por 24hs. As lâminas foram visualizadas no microscópio óptico Axiophot (Carl Zeiss), equipado com objetivas de 40X/0.75 e 100X/1.3 de magnificação/abertura numérica e documentados com a câmera AxioCam MRc por meio do software AxioVisio versão 4.6

Resultados e Discussão

***Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: Uma nova espécie dentro do gênero *Paracoccidioides*.**

A PCM foi inicialmente observada por Adolpho Lutz em dois pacientes na Santa Casa de Misericórdia na cidade de São Paulo/SP em 1908. Uma vez isolado, Adolpho Lutz observou a natureza dimórfica deste

agente etiológico, quando lesões eram colocadas em cultura (Lutz, 1908). Em 1912, Afonso Splendore o classificou como *Zymonema brasiliense* (Splendore, 1912). Em 1930 a nomenclatura binomial *Paracoccidioides brasiliensis* foi introduzida a comunidade científica por Floriano Paulo de Almeida por estas espécies apresentarem semelhanças morfológicas com *C. immitis* (Almeida, 1930). Desde então, *P. brasiliensis* foi considerado uma espécie única e neste presente estudo e por dados da literatura proponho a definição de uma nova espécie para o gênero *Paracoccidioides*: *P. lutzii*. Com a utilização de marcadores moleculares para avaliação intraespecífica de *P. brasiliensis*, um alto grau de variação genética foi detectado em isolados clínicos e ambientais (Soares et al. 1995; Montoya et al., 1997, 1999; Cano et al. 1998; Molinari-Madlum et al. 1999; Nino-Vega et al., 2000; Hahn et al., 2002, 2003; Hebler-Barbosa et al., 2003; Nascimento et al., 2004). Por meios de métodos de detecção de espécies pela concordância genealógica, três espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* foram propostas por Matute et al., (2006) S1/PS2/PS3. Esta publicação não incluiu o isolado Pb01, uma cepa que é estudada por pelo menos 20 anos por nosso grupo. Esta cepa, cedida pelo Instituto de Patologia tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG), foi isolada em 1992 na cidade de Goiânia por Maria do Rosário R. Silva, depositada no ATCC sob registro MYA-826. Estudos utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD mostraram que os isolados Pb01 e 7455 possuíam genótipos exclusivos quando comparados outros isolados de *P. brasiliensis*. A análise de cladograma de 15 isolados geradas também por dados de RAPD confirmaram que o isolado Pb01 se agrupava com os isolados 7455 e 2514 e em um ramo a parte de isolados como Pb18, Pb113, Pb1684 e Bt (Molinari-Madlum et al., 1999), agora definidos como *P. brasiliensis* - S1 (Matute et al., 2006). Além destes estudos, Hahn et al. (2002); Hahn et al., (2003) mostraram que isolados coletados no estado de Mato Grosso também apresentavam um perfil genético distinto dos demais; os isolados RAJ-2, 218, 263, 769, 717, 351, 84 e 133 agrupavam a parte dos demais nos cladogramas gerados a partir de dados de RAPD. Mais tarde, através de genealogias de múltiplos loci, Carrero et al., (2008) e Takayama et al., (2009) mostraram que os isolados Pb01 e IFM54648 se agrupavam separadamente das três espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* previamente descritas. Neste momento, os autores apontavam a possibilidade destes dois isolados crípticos representarem uma nova espécie de *Paracoccidioides*. Por meio de estudos morfológicos e moleculares Teixeira et al., (2009) estenderam os estudos de Carrero et al., 2008 com intuito de incluir isolados clínicos de regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil. Baseado em um par de *primers* desenhado especificamente para o Pb01, 17 novos isolados foram identificados por compartilharem este locus e foram chamados de "*Pb01-like*". Logo em seguida os autores identificaram por filogenias de 13 loci simples e concatenados que estes isolados sempre se agrupavam em

um longo ramo monofilético, aparte do complexo de espécies *P. brasiliensis* fortemente sustentado por valores estatísticos. Os estudos morfológicos apontavam diferenças significativas uma vez que as conídias produzidas pelo isolado Pb01 eram mais alongadas chegando a 22 µm de comprimento enquanto que as de *P. brasiliensis* S1/PS2/PS3 chegam no máximo a 5 µm (Teixeira et al., 2009). Estes estudos são questionáveis quanto ao número de indivíduos, pois características morfológicas podem ser sobrepostas em diferentes espécies filogenéticas. No presente estudo foi proposto o nome científico *Paracoccidioides lutzii* para os isolados "Pb01-like", entretanto a espécie não foi fielmente descrita nos estudos de Teixeira et al., (2009) de acordo com a normas de taxonomia e classificação de fungos. Neste estudo foram genotipados 13 isolados clínicos de *Paracoccidioides* ssp. de regiões de alta incidência de cepas de *P. lutzii*, de acordo com Teixeira et al., 2009; Theodoro et al., in revision PLoS ONE). De acordo com as filogenias geradas para os loci *arf* e *gp43* (Figura 5) os isolados da região Centro-Norte do Brasil ED01, MFC, JHS, JMS, ROSC, PLRO1, 8334, 1578 e EE se agrupam com os demais isolados anteriormente propostos como *P. lutzii* (Teixeira et al., 2009; Teixeira et al., in revision Fungal Biology).

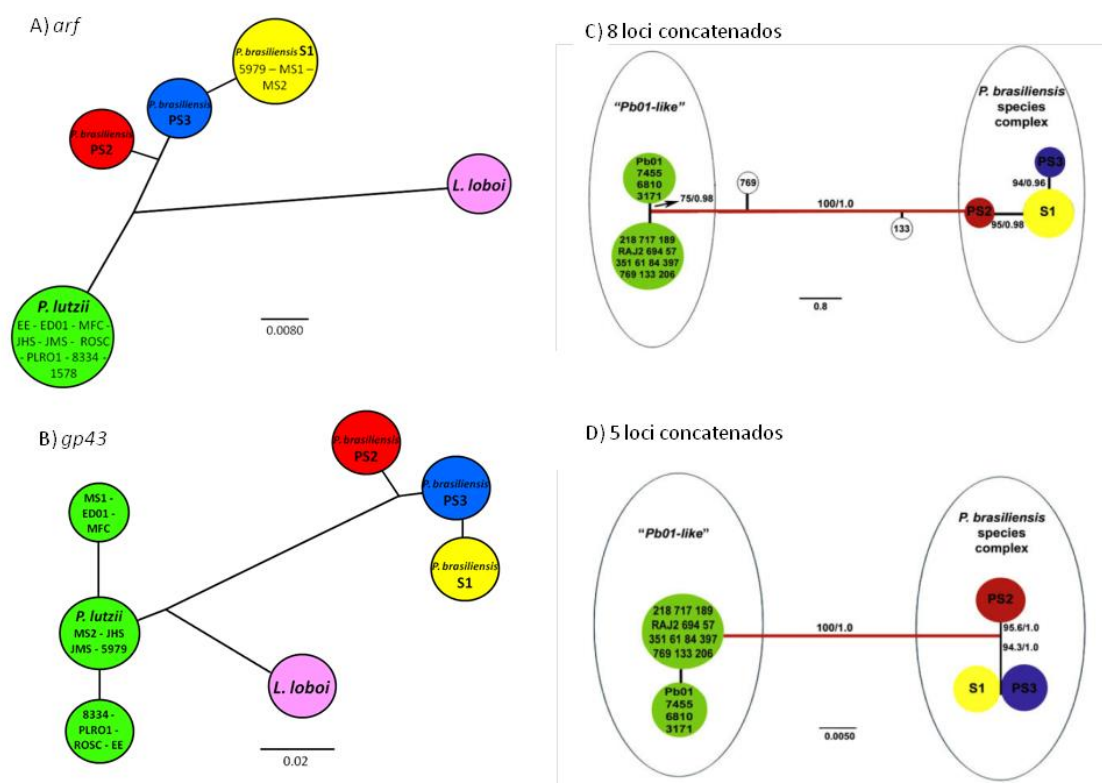


Figura 5. Genealogias individuais geradas para os 2 loci gênicos estudados correspondentes aos genes *arf* (A) e *gp43* (B). Cada árvore foi analisada individualmente pelos métodos de Máxima

Verossimilhança e análise Bayesiana. A árvore gerada pela análise Bayesiana foi escolhida para representar os dados filogenéticos de cada *locus*. Os ramos com valor de *bootstrap*>70 e com probabilidade posterior >0.95 são mostrados. Como *outgroup* foi escolhido a espécie irmã do gênero *Paracoccidioides*: *L. lobo*. As **figuras C e D** representam os filogramas gerados a partir de 8 *loci* concatenados (3.565 nucleotídeos) correspondentes ao conjunto 1 (*fks-E2*, *fks-E3*, *chs-E1*, *chs-E2* 4, *gp43-E1*, *gp43-E2*, *arf* e α -*tubulina*) e 5 *loci* concatenados (1662 nucleotídeos) correspondentes ao conjunto 2 (hidrofobina-3' UTR, hidrofobina-5' UTR, *hsp70*-5'UTR e *intron1*, *kex* *intron1* e ITS 1/2 + 5.8S respectivamente (Teixeira et al., 2009; Teixeira et al., *in revision Fungal Biology*).

Podemos observar também que os isolados 5979, MS1 e MS2 alternam seu agrupamento de acordo com o locus analisado: no locus *arf* (**Figura 5A**) estes se agrupam com os isolados de *P. brasiliensis* S1 enquanto que no locus *gp43* (**Figura 5B**) se agrupam com os isolados de *P. lutzii*. Isolados com genótipos mistos já foram identificados também por Teixeira et al., (2009). Os isolados 133 e 769 não tinham um padrão comum de agrupamento sendo ora classificados como *P. brasiliensis* ora *P. lutzii*. Estes resultados mais uma vez reforçam a possibilidade destes isolados serem híbridos oriundos de um cruzamento entre *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Também podemos atribuir estes isolados mistos por simplesmente ainda carregam polimorfismos ancestrais em seus genomas (Teixeira et al., 2009; Teixeira et al., *in revision Fungal Biology*).

No presente estudo também foi caracterizada a morfologia de conídias de isolados de *P. lutzii* e do complexo de *P. brasiliensis* (S1 e PS2). Como podemos observar na **Figura 6**, as conídias produzidas pelos isolados ED01, ROSC e 1578 (**Figura 6A-E**) possuem um padrão alongado, como inicialmente proposto para o isolado Pb01 (Teixeira et al., 2009). Por outro lado, as conídias produzidas pelos isolados de *P. brasiliensis* (**Figura 6F-I**) possuem conídias menores, com um formato globoso classicamente chamado de "*Chapéu de Napoleão*" como comumente é reportado (Bustamante-Simon et al., 1985, Theodoro et al., *in revision PLoS ONE*). As conídias produzidas pelos isolados de *P. lutzii* medem de 2 até 22 μ m enquanto que as de *P. brasiliensis* medem de 2 até 5 μ m sendo significativamente diferentes morfologicamente.

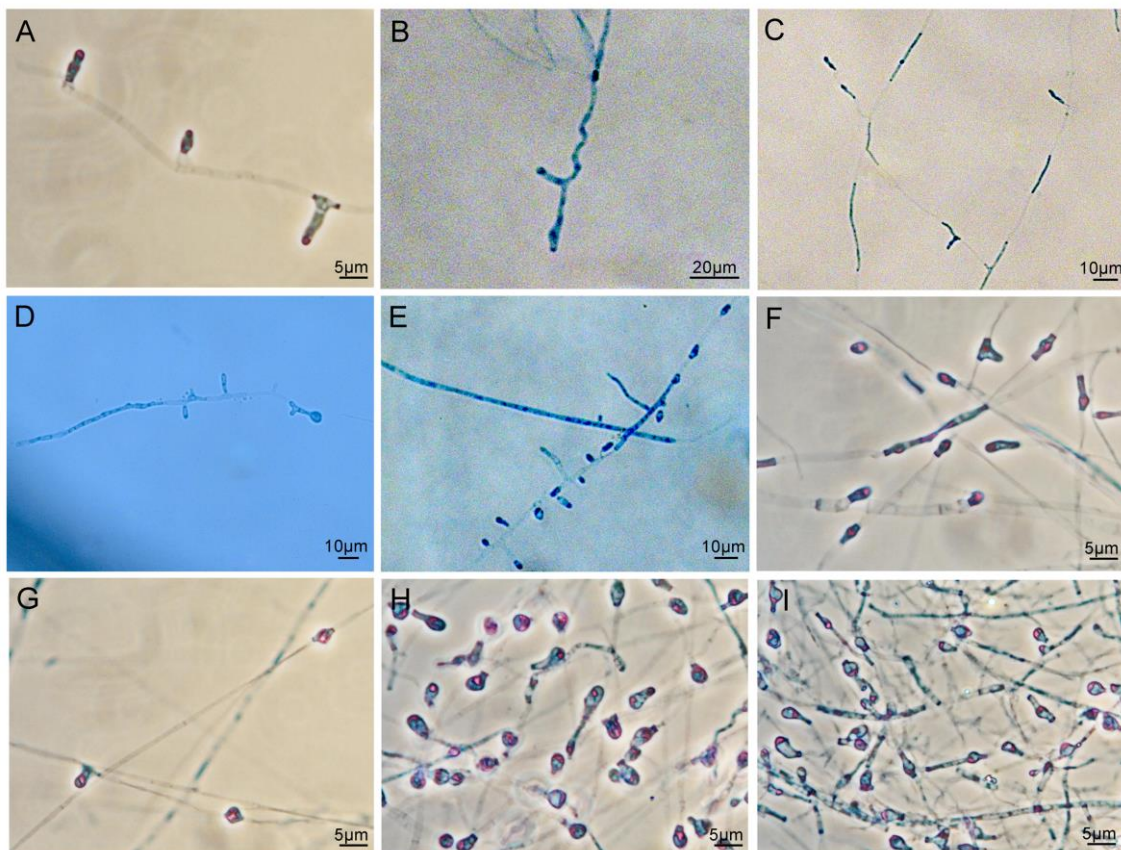


Figura 6. Análises morfológicas das conídias produzidas por células micelianas de *P. lutzii* e *P. brasiliensis*. As imagens foram obtidas de microcultivos corados com azul algodão lactofenol dos isolados Pb01(A) ED01(B e C), ROSC (D e E), e cão (F), T15LN1 (G) e T9B1 (H e I) membros da espécie *P. brasiliensis*. Estas imagens foram obtidas numa magnificação de 100X (A-G) e 400X (H).

Estudos anteriores avaliando a morfologia da coníδια de isolados dos fungos patogênicos do complexo de espécies *Sporothrix*: *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. brasiliensis*, *S. albicans* e *S. mexicana* mostraram diferenças significativas de morfologia. As conídias produzidas por isolados de *S. brasiliensis* e *S. globosa* possuem conídias sésseis do tipo globosa ou sub-globosa enquanto que isolados de *S. schenckii* produzem conídias sésseis triangulares ou cuneiformes. Já os isolados de *S. mexicana* produzem conídias sub-globosas, obovóides, alongadas ou elipsoidal, mostrando uma maior variação. Além de serem filogeneticamente distintas e apresentarem diferenças significativas quanto a sua morfologia, as espécies crípticas de *Sporothrix* possuem diferenças na assimilação da fonte de carbono (Marimon et al., 2007)

Estudos fenotípicos realizados com isolados de *C. immitis* e *C. posadasii* com intuito de avaliar a tolerância a sal (NaCl) mostraram que *C. posadasii* é menos tolerante a altas concentrações de sal que *C. immitis* (Fisher et al., 2003). Além disso foi observado que *C. posadasii* cresce significativamente mais

rápido que *C. immitis* a 37°C e esta diferença pode ser importante no sentido do estabelecimento de exames diferenciais para estes fungos (Baker et al., *submitted to Mycologia*)

Com os grandes esforços somados do Broad Institute (MIT - Harvard) e grupos Latino Americanos foi possível sequenciar o genoma estrutural dos fungos patogênicos humanos *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb3) e *P. lutzii* (Pb01) (Desjardins et al., 2011). Foram produzidas sequências suficientes para cobrir de 8-10X os genomas sequenciados. Com finalidade de se avaliar a acurácia da montagem dos genomas, um mapa óptico do genoma do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* foi gerado e então 94% dos *supercontigs* puderam ser ancorados neste mapa. Os genomas de *P. brasiliensis* são similares em tamanho (Pb18 - 30.0Mb e Pb3 - 28.8 Mb) entretanto o genoma de *P. lutzii* possui cerca de 3Mb a mais em tamanho (Pb01 - 32.9Mb) (**Tabela 2**). O número total de genes preditos variou de 7.875 no genoma de *P. brasiliensis* Pb3 até 9.132 genes em *P. lutzii* e genes duvidosos foram excluídos. Ao final foram obtidos 8.130 genes para o isolado Pb01 de *P. lutzii*, 7.610 genes para o isolado Pb3 de *P. brasiliensis* e 8.042 genes para o isolados Pb18 de *P. brasiliensis*. Os genomas de *P. brasiliensis* são altamente sintênicos, partilhando cerca de 96% de similaridade de sequências, entretanto quando comparados com Pb01 esse percentual cai para 90%, mostrando o alto grau de divergência entre estas cepas. Resultados semelhantes foram encontrados quando o total de genes preditos de *C. immitis* foram comparados diretamente por BlastN no genoma de *C. posadasii*, revelando cerca de 90% de similaridade entre as duas espécies (Sharpton et al., 2009). Uma vez gerados os alinhamentos de alta qualidade dos genomas de *Paracoccidioides*, os polimorfismos de base única (SNP's) foram possíveis de serem identificados.

Tabela 2. Estatísticas das montagens e predições gênicas dos genomas de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb3) e *P. lutzii* (Pb01) - Desjardins et al., 2011

Espécie	<i>P. lutzii</i>		<i>P. brasiliensis</i>	
	Pb01	Pb3	Pb18	
Dados de montagem dos genomas				
Cobertura	8.0X	8.9X	9.8X	
Tamanho total da montagem (Mb)	32.8	29.1	30.0	
Tamanho total dos contigs (Mb)	32.6	28.8	29.4	
<i>Scaffolds</i>	111	65	57	
<i>Scaffold</i> N50 (Mb)	1.02	1.97	2.13	
Contigs	885	552	669	
Contig N50 (kb)	84.3	114.9	109.7	
Qualidade \geq Q40 (%)	98.9	98.9	98.9	
GC (%)	42.8	44.5	44.4	
Dados das predições gênicas				

Genes preditos	9,132	7,875	8,741
Genes duvidosos	1,002	265	699
Genes de alta confiabilidade	8,130	7,610	8,042
Tamanho médio dos genes (nt)	1,814	1,833	1,802
Tamanho médio de sequências codificadoras (nt)	1,330	1,433	1,346
Média do tamanho dos introns (nt)	126	140	132
Média do número de íntrons por gene	3.1	2.5	2.8
Média do número de éxons por gene	4.1	3.5	3.8
GC exônico (%)	49.8	50.4	50.1
GC intrônico (%)	41.7	42.4	42.3

Tipo de elemento	<i>P. lutzii</i> (Pb01)	<i>P. brasiliensis</i> (Pb03)	<i>P. brasiliensis</i> (Pb18)
------------------	-------------------------	-------------------------------	-------------------------------

Tamanho médio intergênico (nt)	1,799	1,848	1,628
tRNAs	118	103	103

Foi possível observar 176.267 SNP's quando comparados os genomas de *P. brasiliensis* Pb18 e Pb3 e foi observado 1 polimorfismo a cada 132 bases. No entanto quando comparados entre *P. brasiliensis* (Pb18) e *P. lutzii* (Pb01) esse número aumentou para 501.313 SNP's sendo encontrado um 1 SNP a cada 26 do genoma. Os genomas de *Paracoccidioides* contêm todos os tipos básicos de elementos transponíveis (**Tabela 3**). Os transposons constituem cerca de 8-9% dos genomas de *P. brasiliensis* Pb18 e Pb3, enquanto que o genoma de *P. lutzii* possui o dobro, atingindo cerca de 16% (**Figura 7**). Os dois principais tipos de elementos de Classe I (retrotransposons), LTR retrotransposons e LINE's estão presentes nos três genomas, entretanto não foram observados elementos do tipo SINE. Foram encontrados mais elementos do tipo Ty3/Gypsy LTR retrotransposons do que elementos do tipo Ty1/Copia, sendo isto típico dos genomas dos fungos. (Dabousy & Capy, 2003). A composição de LTR's retrotransposons varia significativamente nos três genomas de *Paracoccidioides*; *P. lutzii* possui uma expansão de cerca de duas vezes o número de

Tabela 3. Composição de elementos transponíveis nos genomas de *Paracoccidioides* (Desarjins et al., 2011)

DNA Transposons			
DNA	2	10	10
DNA/TcMar	19	15	19
DNA/TcMar-Ant1	1	2	2
DNA/TcMar-Fot1	284	387	417
DNA/TcMar-Mariner	3	3	2
DNA/TcMar-Tc1	1	0	0
Retrotransposons - Elementos de Classe I			
LINE	5	8	8
LINE/Tad1	82	62	88
LTR	277	101	124
LTR/Copia	165	80	41
LTR/Gypsy	442	85	199
Total de Elementos	1,281	753	910
Percentual da Montagem	15.9%	7.7%	9.2%

elementos LTR quando comparados com *P. brasiliensis* (**Tabela 3 e Figura 7**). A maioria dos DNA transposons são conservados nos três genomas de *Paracoccidioides*, entretanto são encontrados em menor frequência no genoma de *P. lutzii*. O repertório de elementos de Classe II incluem as famílias Mariner, hAT, Fot e Ant1, sendo FOT1 e Tc1/Mariner a classe mais prevalente em *P. brasiliensis* quando comparados com *P. lutzii* (Marini et al., 2010).

Elementos transponíveis são responsáveis por diversos efeitos na evolução de genomas como inativação ou modificação gênica, quebra cromossômica, recombinação ou rearranjos cromossômicos, gerando diversidade e delimitando populações (Daboussi 1997, Sawyer e Malik 2006). O desbalanço de determinadas classes de elemento transponíveis aqui mostrados podem ter influenciado no processo de especiação das espécies de *Paracoccidioides* (Marini et al., 2010).

As repetições de baixa complexidade são mais abundantes no genoma do isolado Pb01 de *P. lutzii* quando comparados com o genoma dos isolados de *P. brasiliensis* Pb18 e Pb3 (**Tabela 4**). O genoma da cepa Pb01 possui cerca de 50% mais repetições de baixa complexidade do tipo (AT) quando comparados com os genomas dos isolados Pb18 e Pb3. Certamente o grande aumento de cerca de 3 Mb no genoma de *P. lutzii* se dá pelo grande aumento em número de elementos transponíveis e elementos repetitivos de simples ou de baixa complexidade, representados na **tabela 4**.

Tabela 4. Composição genômica das repetições simples e de baixa complexidade nos genomas de *Paracoccidioides*. (Desarjins et al., 2001)

	Total de bases			Percentual do genoma		
	Pb01	Pb03	Pb18	Pb01	Pb03	Pb18
Repetições simples	417,430	342,908	367,421	1.27%	1.18%	1.23%
Repetições de baixa complexidade	842,793	576,231	589,503	2.56%	1.98%	1.97%
Repetições de baixa complexidade ricas em (AT)	678,392	425,712	441,474	2.08%	1.48%	1.50%

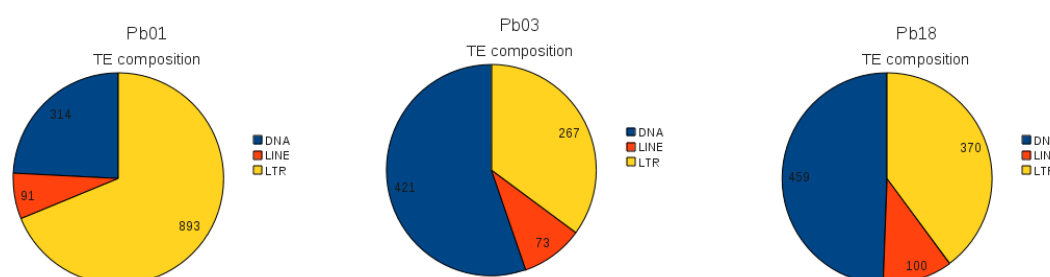


Figura 7. Composição dos elementos transponíveis (TE) nos genomas de *P. lutzii* e *P. brasiliensis* (Extraído de Desarjins et al., 2011).

Os genomas mitocondriais de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* apresentam divergências importantes de serem levantadas no processo que levou a especiação deste gênero. A montagem do genoma mitocondrial do isolado Pb3 totaliza 75 Kb, similar ao total publicado para o isolado Pb18 (Cardoso et al., 2007). Já a montagem do genoma mitocondrial do isolado de *P. lutzii* Pb01 cobre somente a metade do genoma de *P. brasiliensis* totalizando 31Kb. Os genomas mitocondriais dos isolados pb18 e Pb3 são co-lineares partilhando 90% de identidade. Quando comparados os genomas de Pb01 e Pb18 revelam um alto grau de similaridade (89.6%) porém com uma cobertura de somente 54.6%. Significativas diferenças na composição intron/exon dos genes *nad1* e *cob* são observadas entre os genomas mitocondriais destas duas espécies (Desarjins et al., 2001).

Além dos dados de Teixeira et al., (2009), quatro outros trabalhos utilizando diferentes abordagens genômicas apontaram diferenças significativas entre as espécies *P. brasiliensis* e *P. lutzii*: **1)** Identificação de polimorfismos espécie-específicos no gene PRP8, sendo proposto como um bom marcador filogenético para o gênero *Paracoccidioides* (Theodoro et al., 2008); **2)** A distribuição de oito novas famílias de elementos do tipo Tc1/mariner foram propostas e nomeadas de Trem (Transposable element mariner).

Estes elementos estão presentes nos genomas de todas as espécies de *Paracoccidioides* sugerindo que pode ter sido originado de um ancestral comum deste gênero, entretanto existe uma distribuição espécie-específica, (Marini et al., 2010); **3)** A diversidade genética de *P. lutzii* e *P. brasiliensis* foi também acessada em estudos filogenéticos utilizando cinco marcadores mitocondriais que mostraram novamente a excludente monofilia de *P. lutzii*, (Salgado-Salazar et al., 2010); **4)** Estudos filogenômicos comparando os isolados Pb01, Pb18 e Pb3 também mostraram a exclusiva monofilia de *P. lutzii* sendo esta a filogenia de maior quantidade de genes analisados e impacto até hoje na filogenia em fungos (Wang et al., 2009).

Considerando todos os trabalhos relacionados com diferenças morfológicas e genômicas entre *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, nós propomos formalmente a descrição de *P. lutzii* sp. nov. como uma nova espécie. Esta descrição está submetida no periódico *Fungal Biology* e sendo revisado e está anexada no final desta tese.

Aspectos Biogeográficos de *Paracoccidioides*

Alguns aspectos importantes a respeito da filogeografia de *Paracoccidioides* foram estudados no complexo de espécies deste gênero. De acordo com Theodoro et al., (PLoS ONE, *in revision*) a dispersão das espécies de *Paracoccidioides* ocorreu há cerca de 20 milhões de anos atrás. A espécie *P. lutzii* é encontrada predominantemente na região Centro-Oeste do país. De acordo com Teixeira et al., (2009) a espécie *P. lutzii* tinha sido encontrada até então nos estados brasileiros de Goiás e Mato Grosso e um caso isolado foi detectado no Equador (**Figura 8**). Já a espécie *P. brasiliensis* S1 é amplamente distribuída na América Latina, sendo encontrada no Brasil, Argentina, Uruguai, Paraguai, Peru e Venezuela (**Figura 8**). Membros da espécie filogenética PS2 são encontrados em menor número e, até hoje foram documentados na Venezuela e, no Brasil, nos estados de Minas Gerais e São Paulo, em simpatria com S1. Já a espécie filogenética de *P. brasiliensis* PS3 restrita à Colômbia, esta considerada clonal e alopátrica (**Figura 8**) (Matute et al., 2006). *Nested Clade Analysis* (NCA) combinado com filogenias de áreas (Lagrange) sugerem que a espécie PS3 se originou recentemente por eventos de longa dispersão, provavelmente ocorrido por migração de indivíduos da espécie PS1 para Colômbia (Theodoro et al., *in revision*). De acordo com a taxa de substituição de base para o locus *arf*, PS3 surgiu a 1 milhão de anos atrás corroborando o fato de que parte da Colômbia também surgiu recentemente devido a atividades geológicas da Cordilheira dos Andes. Outro fato curioso é que não são encontradas barreiras geográficas claras entre as espécies de *P. brasiliensis* S1, PS2 e *P. lutzii* que possam ser indicadas como possíveis fatores responsáveis pelo processo de especiação do gênero *Paracoccidioides*. A definição de barreiras para microrganismos é uma

questão extremamente complexa, não sendo simples como para plantas e animais. Pequenas variações no clima, temperatura, umidade e ambientes bem como adaptação a diferentes hospedeiros podem criar barreiras ecológicas, sendo suficientes para divergência de espécies e consequente emergência de novos fenótipos (Bagagli et al., 2006; Taylor et al., 2007).

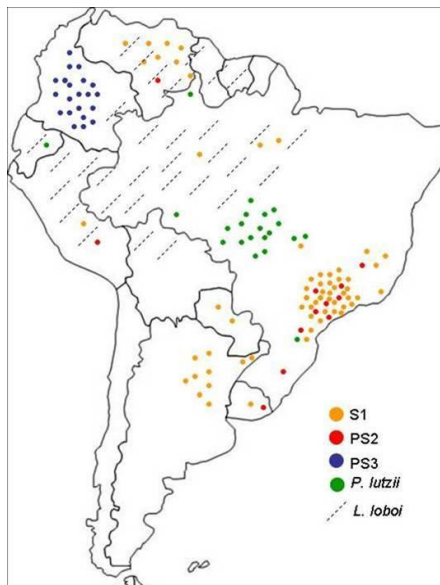


Figura 8. Distribuição geográfica do complexo de espécies filogenéticas do gênero *Paracoccidioides* e sua espécie irmã *L. loboii*. (extraído de Theodoro et al., *in revision PLoS ONE*).

A vegetação predominante onde *P. lutzii* e *P. brasiliensis* (S1 e PS2) são encontrados no Brasil é predominantemente cerrado com algumas áreas de mata atlântica e florestas de araucárias. Uma vez que as áreas onde *P. lutzii* e *P. brasiliensis* (S1 e PS2) são encontrados são relativamente próximas, podemos inferir que sua divergência pode ter ocorrido devido a variação ecológica resultando em um isolamento reprodutivo. Entretanto, a falta de barreiras geográficas pode facilitar a troca de alelos entre *P. lutzii* e *P. brasiliensis*, uma vez que isolados com genótipos híbridos foram demonstrados neste trabalho. Neste estudo mostramos que *P. lutzii* também pode ser encontrado no norte do país, onde os isolados PLRO1 e ROSE oriundos de Rondônia se agrupam com *P. lutzii* (**Figura 5 e 8**). Também foram analisados dois isolados de Mato Grosso do Sul, entretanto de acordo com as filogenias (**Figura 5**) eles possuem genótipos mistos, portanto não podemos definir a espécie e foram considerados como *Paracoccidioides* sp. Um fato interessante é que o estado de Mato Grosso do Sul fica entre Mato-Grosso e São Paulo, sendo estes estados onde *P. lutzii* e *P. brasiliensis* (S1 e PS2) respectivamente são endêmicos. Uma possível explicação é que possa existir uma convergência de áreas entre estas duas espécies gerando genótipos mistos. Isso

ocorre, por exemplo, com o genótipo híbrido AD de *C. neoformans* que são produtos de *mating* entre os genótipos A e D resultante de meioses imperfeitas (Lin et al., 2007).

Espécies crípticas no gênero *Paracoccidioides*: Implicações na clínica e no Diagnóstico da Paracoccidioidomicose

Todas as espécies crípticas no gênero *Paracoccidioides* são agentes causadores da PCM, entretanto algumas importantes particularidades regionais da doença observada no Brasil como diagnóstico, manifestações clínicas e tratamento da doença foram observados desde a descoberta da PCM. A primeira discriminação entre formas da PCM relacionadas a origem geográfica e patologia foi feita por Barbosa et al., (1968), onde foi possível mostrar que pacientes oriundos do estados de Goiás apresentavam forma linfático-abdominais. Estas observações também foram reportadas por Andrade (1983) que avaliou 57 pacientes no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás. Existe a possibilidade das formas linfático-abdominais estarem associadas a patologia causada por *P. lutzii* e não por *P. brasiliensis*? Esta possibilidade não deve ser descartada e sim investigada a fundo a fim de se verificar possíveis associações de espécies crípticas e diferentes manifestações clínicas. Por exemplo, *C. neoformans* e *C. gattii* que induzem diferentes patologias criptococcócicas: *C. neoformans* é frequentemente observado na urina e sangue de pacientes imunodeficientes, enquanto que *C. gattii* produz meningite e pode ser encontrado no sistema nervoso central e pulmões de pacientes imunocompetentes (Speed & Dunt, 1995). Por outro lado, até hoje não existem evidências de que as espécies filogenéticas *C. immitis* e *C. posadasii* possam induzir diferentes patologias em pacientes com Coccidioidomicose (Cox & Magee 2004; Barker et al. *in press*).

filogenéticas no gênero (**Figura 9A**) (Moraes et al., 2002; Hebeler-Barbosa et al., 2003; Matute et al., 2006; Teixeira et al., 2009). Este gene acumula um grande número de substituições não sinônimas e estudos de evolução molecular mostraram que este gene está sob pressão de seleção (Matute et al., 2008). Foi demonstrado recentemente que, sorologias realizadas com antígenos produzidos por isolados de São Paulo cruzados com soros de pacientes de Mato-Grosso apresentam um baixos números de positivos. quando o antígeno e o soro são obtidos da mesma região geográfica o percentual de sorologias positivas chega oscila de 92%-100%. Exames sorológicos feitos nos anos de 2007 e 2008 em pacientes de Rondônia mostraram um baixo número de testes positivos (7% e 1.8% respectivamente). Estes exames foram realizados no Instituto Adolpho Lutz em São Paulo que utiliza o antígeno produzidos pelo isolado Pb339 de São Paulo (*P. brasiliensis* - S1), ressaltando a grande impacto da origem geográfica do agente causador desta doença (Durlacher & Lima, *manuscript in preparation*). Os testes falso-negativos podem ser interpretados de forma errônea por médicos e epidemiologistas como quadros de comprometimento pulmonar por tuberculose (Leão & Mendes, 1980; Paniago et al., 2003; Quagliato Jr. et al., 2007). Além de questões abordadas na clínica, algumas abordagens quanto ao tratamento foram levantadas por Hahn et al., (2003) podendo haver diferenças significativas quanto a origem filogenética do fungo. Baseado em dados de RAPD, os isolados que agrupavam no clado II (agora conhecido com *P. lutzii*) possuíam uma boa resposta a terapia com trimetoprina-sulfametoxazol, ao contrário dos isolados do clado I (agora sabidamente conhecido como *P. brasiliensis* - S1). Sem dúvida, essas questões são críticas e necessitam de uma urgente exploração a fim de melhorar os métodos de diagnóstico e terapêutica que possam detectar e efetivamente combater especificamente as espécies de *Paracoccidioides* de um dado paciente com PCM.

Conclusão

De acordo com os dados genômicos e morfológicos aqui apresentamos, concluímos que o clado correspondente aos isolados "*Pb01-like*" se trata de uma nova espécie do gênero *Paracoccidioides*: *P. lutzii*. *P. lutzii* pode ser discriminado de do complexo de espécie *P. brasiliensis* por uma série de polimorfismos identificados por Theodoro et al., (2008); Teixeira et al., (2009). Além disso, mostramos que as comparações genômicas entre os isolados Pb01 (*P. lutzii*) e Pb18/Pb3 (*P. brasiliensis*) também sustentam a divisão de *P. brasiliensis* em duas espécies. O experimento comparando a morfologia das conídias entre as espécies de *Paracoccidioides* mostrou que as estruturas produzidas por isolados de *P. lutzii* são alongadas entre os isolados analisados não sendo apresentados pelos isolados de *P. brasiliensis*. Por fim, exaltamos a

necessidade de se explorar a parte clínica e do diagnóstico entre as duas espécies, uma vez que dados da literatura mostram peculiaridades nestas áreas entre as duas espécies estudadas.

Capítulo 2: Análise genômica e morfológica sustentam a existência de ciclo sexual no gênero *Paracoccidioides*

Introdução

***Mating* na família Ajellomycetaceae**

Os fungos possuem mais de uma opção reprodutiva, fenômeno este chamado de pleomorfia (Sugiyama, 1987) e esse fenômeno biológico desempenha um papel importante na manutenção das espécies. Em uma população estritamente clonal, um genótipo único é mantida em uma população evitando a fragmentação em clados endêmicos. Em espécies recombinantes, os indivíduos são genotipicamente diferentes, hábeis a se dispersarem e terem ciclo de vida sexual, estabelecendo populações endêmicas (Taylor et al., 2007). O ciclo sexual nos fungos pode ocorrer por mecanismo heterotálico (auto-estéril) ou homotálico (auto-fértil). Nas espécies heterotálicas, o *mating* ocorre entre dois indivíduos sexualmente compatíveis, morfologicamente idênticos, porém distinguíveis geneticamente pelo seu tipo sexual ou "*mating type*". Nas espécies homotálicas, cada indivíduo pode fazer *mating* com ela mesma, possuindo os dois loci sexuais no mesmo genoma. O sistema de *mating* nos fungos Ascomycetos é predominantemente bipolar, no qual existem duas possibilidades de sequências no locus sexual (*MAT*). A estrutura molecular foi primeiramente descoberta em *S. cerevisiae*, no qual é possível identificar isolados α e a , distinguíveis por genes diferentes presentes no locus *MAT*. A análise do locus *MAT* de um fungo filamentosos leva a identificação do seu idiomorfo sexual, denotando que são sequências não relacionadas presentes no mesmo locus homólogo. A grande disponibilidade de sequências de genomas de fungos se deu pelo grande avanço nas plataformas de sequenciamento de alto desempenho geradas a partir de 2005. De acordo com dados levantados no principal banco genômico que agrega sequências da maior parte dos centros de sequenciamento de DNA do mundo (NCBI), existem hoje 231 espécies fúngicas sequenciadas, sendo que 43 genomas são de fungos patogênicos. A divisão criada no Broad Institute chamada *Fungal Genome Initiative* (FGI) tem como objetivo acessar a diversidade genômica de fungos de importância médica, agrícola, ambiental e biotecnológica (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/projects/fungal-genome-initiative/fungal-genome-initiative>), colaborando significativamente com o aumento dos bancos genômicos destas espécies.

O conteúdo gênico e a ordem dos genes no locus *MAT* dos Ascomycetos variam muito, entretanto a porção *MAT* é extremamente conservada. Na grande maioria dos Ascomycotina o locus *MAT* está delimitado ou flanqueado por homólogos a *apn2*, (gene que codifica uma endonuclease/DNA liase) e *s/a2* (gene que codifica uma proteína que se liga ao trecho cortical da actina). O locus *MAT1-1* codifica para um

fator transcricional do tipo α -box enquanto que o locus *MAT1-2* codifica para um fator transcricional do tipo HMG. Estes são controladores globais do *mating*, regulando direta ou indiretamente a expressão de genes responsáveis ao *mating* como receptores de feromônios (*ste2* e *ste2*), agentes da via de sinalização de *mating* MAPK (*GBA1*, *ste4*, *ste18*, *ste20*, *ste11*, *ste7* e *fus3*), enzimas processadores de feromônios (*ram1*, *ram2*, *rce1*, *ste24*, *ste14*, *ste6*, *kex1*, *kex2* e *ste13*) e outros fatores transcricionais como *ste12*. Basicamente feromônios de tipos **a** e **α** são liberados no meio externo e por quimiotaxia, mediada via receptores, seus respectivos receptores STE2 e STE3 são reconhecidos o que desfosfolira a proteína G que está acoplada passando o sinal para o citoplasma. Por meio de sucessivas fosforizações da via MAPK, o sinal é passado ao fator transcricional *ste12* que migra para o núcleo ativando a cascata de *mating* (Heitman et al., 2007)

Os loci *MAT* dos fungos dimórficos patogênicos humanos *C. immitis*, *C. posadasii* (Onygenaceae) e *H. capsulatum* (Ajellomycetaceae) foram identificados e caracterizados por Fraser et al., (2007). Os estudos indicaram que as três espécies foram consideradas heterotálicas, possuindo um sistema bipolar de *mating*, com isolados possuindo genes do tipo α -box (*MAT1-1 transcription activator*) ou HMG (*MAT1-2 high motility group*). O locus destes genes possuem semelhanças estruturais e de composição gênica quando comparados com *A. fumigatus*. Em seguida, estudos utilizando marcadores específicos para os idiomorfos *MAT1-1* e *MAT1-2* mostraram que diferentes tipo sexuais são responsáveis pelo sucesso do acasalamento em *H. capsulatum*. Os autores também mostraram que os diferentes tipos sexuais respondem transcricionalmente a indução por moléculas de feromônios, aumentando os níveis de mRNA dos genes *MAT1-1* e *MAT1-2* (Bubnick e Smulian, 2007).

O ciclo sexual dos fungos patogênicos dimórficos foi descrito inicialmente em *B. dermatitidis* e seu teleomorfo foi nomeado de *Ajellomyces dermatitidis* (McDonough & Lewis, 1967). Anos mais tarde Kwon Chung J, (1973) e Sigler L, (1992) mostraram a fase sexual de *H. capsulatum* e *Emmonsia ssp.*, sendo ambos teleomorfos incluídos no gênero *Ajellomyces* (**Figura 1**). A fase inicial do ciclo sexual destas espécies ocorre quando duas hifas de idiomorfos sexuais oposto não diferenciadas morfológicamente começam a se enovelar uma nas outras diversas vezes formando estruturas espiraladas chamadas de ascocarpos iniciais ou jovens. As pontas das hifas começam a inchar e formar estruturas em forma de cachimbo (*knob-like structures*). Um grupo de hifas ascogônias se desenvolvem no centro do ascocarpo jovem. A medida que as hifas se tornam mais espiraladas, ramificações laterais são formadas próximas as hifas enoveladas formando hifas peridiais e por fim são formados os cleistotécios globosos ou sub-globosos (McDonough & Lewis, 1967; Kwno-Chung, 1973; Kwno-Chung, 1975). O teleomorfo dos membros da família Ajellomycetaceae possuem uma ascomata globosa com apêndices enovelados, ascósporos globosos ou

achatado nos polos e não possuem atividade queranolítica como outros dermatófitos. Entretanto os gêneros anamorfos *Paracoccidioides* e *Lacazia* foram considerados assexuais por muito tempo e foram erroneamente considerados membros do filo imperfeito Deuteromycota (**Figura 1**)(San-Blas et al., 2002).

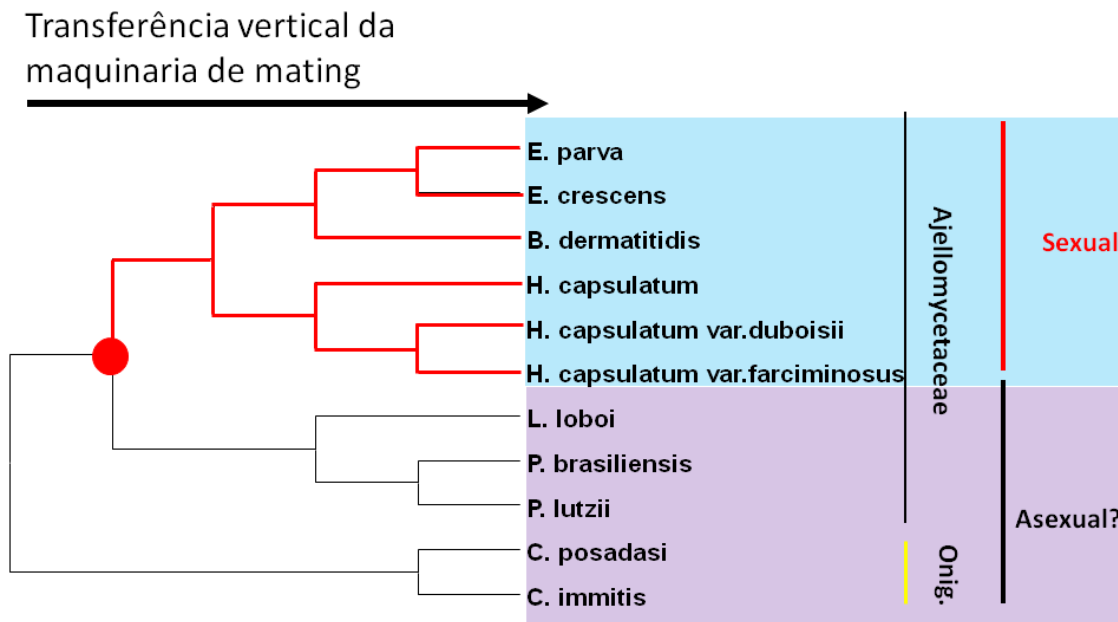


Figura 1: Distribuição filogenética das espécies constituintes da família Ajellomycetaceae, baseado na filogenia da região ITS + 5.8 S (Teixeira et al., 2009). Em azul se destacam as espécies que possuem ciclo sexuado e em roxo estão as espécies que supostamente teriam recebido a maquinaria genômica relacionada a reprodução sexuada.

Apesar de não ter sido descrito ainda um ciclo sexual nas espécies do gênero *Paracoccidioides*, estudos de especiação sugerem fortemente a existência de um ciclo sexual neste gênero devido à presença de espécies crípticas e também pela presença de eventos de recombinação. Diante destas evidências este presente trabalho visa a busca de evidências moleculares e morfológicas da presença de ciclo sexuado nas espécies de *Paracoccidioides*.

Justificativa

O presente trabalho visa investigar a possibilidade da ocorrência de reprodução sexuada no ciclo de vida de *Paracoccidioides* uma vez que evidências moleculares sustentam esse estágio no ciclo de vida deste fungo. O ciclo sexual é importante para manutenção genômica uma vez que possibilita a eliminação de mutações deletérias do genoma via recombinação (revisado por Heitman, 2006). O fato de possuir tanto

a alternativa sexuada como assexuada permite ao fungo manter populações clonais quando está adaptado ao ambiente e gerar diversidade via recombinação quando necessário for. Isso pode estar totalmente relacionado com a diversidade genética presente na população de *Paracoccidioides* e que afeta diretamente a população humana uma vez que diferentes composições antigênicas são produzidas por fungos de diferentes genótipos, levando a um diagnóstico sorológico falso-negativo. Além disso, diferentes genótipos podem apresentar níveis de resistência a antifúngicos distintos gerando um grande problema no tratamento da PCM.

Objetivo Geral

Este trabalho pretende identificar e caracterizar a maquinaria de *mating* em nível genômico e de expressão gênica e, por cruzamentos "*in vitro*", demonstrar a presença de estruturas morfológicas relacionadas ao ciclo sexual no gênero *Paracoccidioides*.

Objetivos Específicos

- 1 – Identificar os genes reguladores de *mating*, previamente descritos em *S. cerevisiae* e *A. fumigatus*, nos genomas disponíveis dos fungos patogênicos dimórficos;
- 2 - Caracterizar em nível genômico e avaliar a distribuição dos idiomorfos *MAT1-1* e *MAT 1-2* em isolados clínicos e ambientais nas populações de *Paracoccidioides*;
- 3 - Quantificar os níveis de mRNA por PCR em tempo real dos transcritos *MAT1-1*, *MAT1-2*, *ste2*, *ste3*, *fus3* e *ste12* em isolados de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* nas formas de micélio e levedura;
- 4 – Caracterizar e avaliar o nível dos transcritos relativos ao gene precursor do feromônio α em células de levedura e micélio de *P. lutzii* e *P. brasiliensis*;
- 5 – Avaliar o nível de expressão por PCR em tempo real dos genes relacionados ao *mating* em células de idiomorfos sexuais opostos, após estímulo de células de micélio de tipos sexuais opostos co-cultivadas em meio mínimo;
- 6 - Caracterização "*in vitro*" de estruturas relacionadas ao estágio sexual de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* a partir de cruzamentos de cepas de tipos sexuais opostos previamente caracterizadas;

Materiais e Métodos

1 - Identificação do locus *MAT* nas espécies de *Paracoccidioides*

O locus *MAT* de *Paracoccidioides* foi identificado baseado em análises comparativas de bioinformática usando como molde os loci *MAT* de *H. capsulatum*, *C. immitis* e *C. posadasii*. As sequências dos genes correspondentes aos genes *MAT1-1* (α -box) e *MAT1-2* (HMG) dos fungos citados acima foram comparadas por BlastX com os genomas de *Paracoccidioides*. Logo em seguida, os principais componentes delimitadores do locus *MAT* (*sla2*, *apn* e *cox13*) foram identificados por BlastX ao longo do supercontig em que os genes *MAT1-1* ou *MAT1-2* estavam presente. Nesse sentido a estrutura não homologa correspondente ao locus *MAT1-1* e *MAT1-2* foram definidos e assim determinados seus tamanhos e composição gênica de cada um.

2 - Caracterização dos genes reguladores de *mating* e meiose em *Paracoccidioides*

Genes ortólogos, envolvidos no processo de *mating* e meioses caracterizados em *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *N. crassa*, *A. fumigatus* e *A. nidulans*, foram identificados via BlastP ou blast bi-direcional entre os genomas dos fungos dimórficos *P. lutzii*, *P. brasiliensis*, *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *C. immitis* and *C. posadasii*. Os genes foram considerados ortólogos aqueles que possuísem *e-value* $>1e^{-13}$ e *query/subject coverage* de $\geq 45\%$.

3 - Distribuição do locus *MAT* e análise filogenética na população de *Paracoccidioides*

Com intuito de se avaliar a distribuição dos idiomorfos sexuais *MAT1-1* e *MAT1-2* na população constituída de 98 isolados *Paracoccidioides* (**Tabela 1**), *primers* exclusivos cada uma das duas regiões foram desenhados para o locus *MAT* caracterizado neste estudo. Para o locus *MAT1-1* contendo o gene α -box, foram usados os oligonucleotídeos senso 5' (GCCAGGATGATAGGAAACGAAGTC 3') e antisenso (5' GGGAAAGATCCGGGAATACAGTAG 3'). Para o locus *MAT 1-2* contendo o gene HMG, foram utilizados os oligonucleotídeos senso (5' GAAGGCTTTCGAGGAGCATATTGATAG 3) e antisenso (5' GAGTGCTATGAACCATCTGAAGTCTAC 3'). As amplificações para PCR foram constituídas de: 10 μ L de

Tabela 1. Identificação, idiomorfo sexual e espécie de cada isolado utilizado para avaliar a distribuição sexual das espécies de *Paracoccidioides*

Isolado	Idiomorfo Sexual	Espécie
Pb01	MAT1-1	<i>P. lutzii</i>
3171	MAT1-2	<i>P. lutzii</i>
EE	MAT1-2	<i>P. lutzii</i>
RAJ-2	MAT1-2	<i>P. lutzii</i>
Pb3	MAT1-2	<i>P. brasiliensis</i> – PS2
Pb73	MAT1-1	<i>P. brasiliensis</i> – PS3
Pb18	MAT1-1/MAT1-2	<i>P. brasiliensis</i> – S1
Pb2	MAT1-1	<i>P. brasiliensis</i> – PS2
Pb4	MAT1-1	<i>P. brasiliensis</i> – PS2
192	MAT1-1	N.I.
113	MAT1-1	N.I.
Higuita/P196	MAT1-2	<i>P. brasiliensis</i> – PS3
Beto	MAT1-1	N.I.
135	MAT1-2	<i>P. brasiliensis</i> – S1
300	MAT1-1/MAT1-2	<i>P. brasiliensis</i> – S1
7455	MAT1-1/MAT1-2	<i>P. lutzii</i>
6810	MAT1-1	<i>P. lutzii</i>
MND	MAT1-1	<i>P. lutzii</i>
JMS	MAT1-2	<i>P. lutzii</i>
728	MAT1-1/MAT1-2	N.I.
6171	MAT1-1/MAT1-2	N.I.
Edi	MAT1-1	N.I.
68	MAT1-1	N.I.
SN	MAT1-1	N.I.
JT-5	MAT1-1	N.I.
Givaldo	MAT1-1	N.I.

1684	MAT1-1	<i>P. brasiliensis</i> – S1
PbBT	MAT1-1	<i>P. brasiliensis</i> – S1
662	MAT1-2	N.I.
JHS	MAT1-2	<i>P. lutzii</i>
769	MAT1-1	N.I.*
133	MAT1-1/MAT1-2	N.I.*
397	MAT1-1	<i>P. lutzii</i>
307	MAT1-1/MAT1-2	<i>P. barsiliensis</i> – S1
14-121	MAT1-1	<i>P. brasiliensis</i> – S1
305	MAT1-1	<i>P. brasiliensis</i> – S1
Pingüim	MAT1-1	N.I.
351	MAT1-1/MAT1-2	<i>P. lutzii</i>
5979	MAT1-1/MAT1-2	<i>P. lutzii</i>
698	MAT1-2	N.I.
JAL	MAT1-1	<i>P. lutzii</i>
52	MAT1-1	N.I.
53	MAT1-2	N.I.
TATU	MAT1-2	N.I.
262	MAT1-2	N.I.
1578	MAT1-1	<i>P. lutzii</i>
8434	MAT1-1	<i>P. lutzii</i>
5979	MAT1-1	<i>P. lutzii</i>
6184	MAT1-1	N.I.
16	MAT1-2	N.I.
D03	MAT1-2	N.I.
D01	MAT1-2	N.I.
265	MAT1-2	N.I.

EPM101	MAT1-1	N.I.
EPM77	MAT1-2	N.I.
BT84	MAT1-1	<i>P. brasiliensis</i> – PS2
BT60	MAT1-1	<i>P. brasiliensis</i> – S1
S1 Baço	MAT1-1	N.I.
T9B1	MAT1-1	<i>P. brasiliensis</i> – S1
T8LN2	MAT1-1	N.I.
T7B6	MAT1-1	<i>P. brasiliensis</i> – S1
T3B6	MAT1-1	<i>P. brasiliensis</i> – S1
T1F1	MAT1-1	<i>P. brasiliensis</i> – S1
EPM75	MAT1-1	N.I.
D11	MAT1-1	N.I.
D10	MAT1-2	N.I.
D07	MAT1-2	N.I.
D06	MAT1-2	N.I.
MFC	MAT1-1	<i>P. lutzii</i>
309	MAT1-1	<i>P. brasiliensis</i> – S1
P934	MAT1-1	N.I.
2069	MAT1-1	N.I.
66	MAT1-1	<i>P. lutzii</i>
8934	MAT1-1	<i>P.lutzii</i>
T4B17	MAT1-1	N.I.
BT85	MAT1-1/MAT1-2	N.I.
T10B1	MAT1-2	<i>P. brasiliensis</i> – PS2
T13LN2	MAT1-1	N.I.
ILSL57	MAT1-2	N.I.
CÃO	MAT1-1	<i>P. brasiliensis</i> – PS2

1430	MAT1-1	N.I.
D02	MAT1-1	N.I.
D04	MAT1-1	N.I.
D09	MAT1-1	N.I.
D05	MAT1-2	N.I.
EPM04	MAT1-1/MAT1-2	N.I.
EPM85	MAT1-2	N.I.
EPM83	MAT1-2	N.I.
Pb21	MAT1-2	N.I.
ED01	MAT1-1	<i>P. lutzii</i>
PLRO1	MAT1-2	<i>P. lutzii</i>
Pb9	MAT1-1	<i>P. brasiliensis</i> – S1
Pb339	MAT1-1	<i>P. brasiliensis</i> – S1
T15LN1	MAT1-2	<i>P. brasiliensis</i> – S1
JT-4	MAT1-1	N.I.
T8B1	MAT1-2	<i>P. brasiliensis</i> – S1
4268	MAT1-1/MAT1-2	N.I.
262	MAT1-2	N.I.

N.I. Espécie de *Paracoccidioides* não caracterizada.

* Os isolados 769 e 133 isolates compartilha alelos com ambos *P. brasiliensis* e *P. lutzii* species e não podem ser sistematicamente classificados

PyroStart™ *Fast PCR* Master Mix (2X) - (Fermentas), 0,5 µM de cada oligonucleotídeo, 40ng de DNA genômico e água ultra-pura *q.s.p.* 20 µL. Os ciclos da PCR foram constituídos das seguintes etapas: Pré-desnaturação de 1 minutos a 94°C; amplificação em 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 segundo, anelamento a 50 °C (para os dois loci) por 5 segundos e extensão final de 68°C por 25 segundos. Uma etapa de 10 segundos de extensão final a 68 °C foi adicionada. Vale a pena ressaltar que as reações foram

feitas para os loci *MAT 1-1* e *MAT1-2* de forma independente, então foram feitas duas reações para cada isolado. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0.8% e o idiomorfo sexual foi identificado (**Tabela 1**). Foram selecionados dezesseis amplicons positivos para o locus *MAT1-1* e onze positivos para o locus *MAT1-2* para o sequenciamento. As sequências dos amplicons foram obtidas por sequenciamento automático no MegaBace 500 usando os kits DYEnamic ET Terminator Kit (GE Healthcare). Os fragmentos foram sequenciados em ambas as fitas e as bases com phred>30 foram consideradas para o alinhamento. As sequências foram depositadas no GenBank (*MAT1-1* - HQ687769-HQ687784 e *MAT1-2* HQ687785-HQ687795) e alinhadas com auxílio do algoritmo PRANK (Loytynoja & Goldman, 2005), implementado no software PRANKSTER e finalmente manualmente inspecionadas. As análises filogenéticas foram conduzidas pelo método Bayesiano como reportado no tópico 4 desta seção.

4 - Análise quantitativa da expressão dos genes relacionados à reprodução sexuada nas forma de micélio e levedura de *Paracoccidioides*

Com intuito de avaliar a expressão dos genes relacionados à reprodução sexuada, a expressão dos genes α -box *MAT1-1*, HMG *MAT1-2*, receptores de feromônios *ste2* e *ste3*, a MAPK *fus3* e o ativador transcricional *ste12* foram quantificados pela técnica de PCR em tempo Real. As cepas Pb18, Pb3, T15LN1, T1F1 e T9B1 de *P. brasiliensis* e as cepas Pb01 e EE de *P. lutzii* nas formas de micélio e levedura foram cultivadas em meio YPD (ver item 1) por 14 dias a 25°C e 37°C respectivamente. Logo após esse período, as células foram sedimentadas por centrifugação (5000xg por 10 minutos) acompanhadas por extração de RNA com o reagente Trizol (Invitrogen) de acordo com as normas do fabricante. Com a finalidade de remover qualquer contaminante de DNA genômico, as amostras foram tratadas com RNase-free-DNaseI (Promega) e em seguida precipitadas com etanol. As amostras de RNA forma inspecionadas

Tabela 2. Primers desenvolvidos para os experimento de PCR em tempo real

Locus	Oligonucleotídeo	Direção	Sequência
<i>α-box(MAT1-1)</i>	RETlalphaF	Senso	5'CCCGGATCTTTCCCAAGAAG3'
	RETlalphaR	Anti-Senso	5'GGATTGCCCACTTTGCTTTG3'
HMG(<i>MAT1-2</i>)	RETIHMGF	Senso	5'CAAACGCCAATTTCTCTCATC3'
	RETIHMGF	Anti-Senso	5'AGCTGCGGACTCGGTATAAGAG3'
HMG(<i>MAT1-2</i>)*	HMGlutziif	Senso	5'CGTTCAAAGACAACGTGAATGG3'
	HMGlutziir	Anti-Senso	5'TCATCCGTGGGCCAGATAAG3'
<i>ste3</i>	<i>ste3</i> F	Senso	5'TTTCCTGCATCCTGCCCTAT3'
	<i>ste3</i> R	Anti-Senso	5'TCATCCGTGGGCCAGATAAG3'
<i>ste2</i>	<i>ste2</i> F	Senso	5'GGTTTGGTGCTATGCAGGTTATG3'
	<i>ste2</i> R	Anti-Senso	5'GGAGTGGGTATTGGAGAATTGAGA3'
<i>fus3</i>	<i>fus3</i> F	Senso	5'AGGACCTTTCCGACGACCAT3'
	<i>fus3</i> R	Anti-Senso	5'AACGTTTCGAGAGTGCATAGC3'
<i>ste12</i>	<i>ste12</i> F	Senso	5'GGATTTGGGAAGTAACCACTCTACC3'
	<i>ste12</i> R	Anti-Senso	5'CCCAGCACCAGTCACAGTAAAG3'

gel de agarose 0.8% a fim de avaliar a integridade do RNA's e logo em seguida quantificadas por espectrofotometria no aparelho NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Uma quantidade de 2 µg de cada amostra foi reversamente transcrita (Superscript III; Invitrogen) usando oligo(dT)₁₂₋₁₈ *primer* e então submetidas ao PCR em tempo real. Os experimentos de amplificação foram realizadas na plataforma 7500 Fast System (Applied Biosystems) em volumes de 10 µl contendo 0.2 µM de cada *primer* (**Tabela 2**), 5 µl de SYBR Green PCR Master Mix (2x) - (Applied Biosystems) e como molde, 0.02 ul de cada cDNA. Após um passo de desnaturação inicial a 95°C por 20 segundos, as amplificações foram feitas em 40 ciclos compostos de 95°C por 3 segundos e 60°C por 20 segundos. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. Ao final dos ciclos de amplificação os produtos de PCR foram submetidos a análises de curva de desnaturação a fim de se avaliar a especificidade dos produtos amplificados. O Método CT comparativo foi utilizado para avaliar o valor de expressão de cada gene, tendo o gene constitutivo α -tubulina como normalizador.

Analizamos também a expressão dos gene precursor do feromônio α (*ppg1*) em células de micélio e levedura de *P. brasiliensis* Pb3, T15LN1, e T9B1 e as cepas Pb01 e EE de *P. lutzii*. Além disto, através de ferramentas de BLAST buscamos por EST's deste gene presentes nos transcriptomas de micélio e levedura do isolado Pb01 de *P. lutzii* (Felipe et al., 2005).

5 - Estímulo por feromônio

Para os experimentos de estimulação com meio condicionado (CM) cerca de 500mg de peso seco de micélio de cada cepa de tipo sexuais opostos (T9B1 - *MAT 1-1* e T15LN1 - *MAT1-2*) foram co-cultivadas em frascos do tipo Erlenmeyer contendo 500 ml de meio YEM (0.1%, MgSO₄·7H₂O, 0.15% KH₂PO₄, 0.1% NaNO₃, 0.05% extrato de levedura - Known-Chung et al., 1973). Os fungos foram incubados a 25°C por 21 dias sob agitação de 150rpm, e logo após esse período o sobrenadante representando o meio condicionado foi coletado por filtração em membrana de 0.22 µm. Em paralelo, os isolados T9B1 e T15LN1 foram crescidos independentemente em 20 ml de YEM por 14 dias e os micélio foram coletados por centrifugação por 5 minutos a 2300g e, sendo finalmente lavados três vezes em tampão PBS 1X (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.144% Na₂HPO₄ e 0.024% KH₂PO₄). Cada amostra de micélio foi separadamente estimulada com 20 ml de CM previamente coletado por 24hs a 25 °C sob 150 rpm de agitação. Após esse período, as extrações de RNA foram realizadas com o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as normas do fabricante. Como controle negativo da indução cada isolado crescido independentemente foi

estimulado em 20ml de YEM nas mesmas condições acima citadas e todos experimentos foram feitos em triplicata. O RNA total extraído foi tratado com RNase-free-DNaseI (Promega) como descrito no tópico 10.

6 - Cruzamentos "*in vitro*" entre cepas de *Paracoccidioides*

Os teste de *mating* foram realizados em pares de cepas de tipos sexuais opostos por microcultivos ou diretamente co-cultivados em placas contendo meio de cultura apropriado com ágar. Os meios de cultura selecionados foram: suco V8 ágar (0.2% v/v suco V8 Campbell, 0.3% CaCO₃ e 1.5% ágar), ágar extrato de solo (SEA; 0.2% glicose, 0.1% extrato de levedura, 1.5% ágar e 50% v/v extrato de solo coletado de tocas de tatu, previamente filtrados e autoclavado), ágar extrato de tomate-aveia (OTA; 2% extrato de tomate elefante, 2% aveia em flocos Dr. Otker, 0.3% CaCO₃ e 1.5% ágar). Os pares de cruzamentos foram realizados com isolados da mesma espécie filogenética: *P. brasiliensis* (Matute et al., 2006) e *P. lutzii* (Teixeira et al., 2009). Nos cruzamentos utilizando a técnica de microcultivo, isolados da mesma espécie foram plantados nos blocos de ágar par a par. Já nos cruzamentos usando placas de ágar "*plugs*" de micélio foram semeados diretamente nos meios selecionados, 1 cm a parte um dos outros. As placas foram seladas com Parafilm (Pechiney Plastic Packaging) e mantidas a 25°C no escuro. Os cruzamentos em placa foram analisados no estereomicroscópio Stemi 2000C para avaliar a presença de cleistotécio ou emaranhados de hifas presentes nas periferias das colônias de micélio. Os experimentos também foram analisados por microscopia óptica, coradas com lactofenol azul algodão. Além disso, as amostras foram fixadas em etanol 70% por 24 horas a 4°C, lavadas em solução PBS 1X (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.144% Na₂HPO₄ e 0.024% KH₂PO₄) e então coradas por 1 hora em calcofluor e SYBR GREEN I (Invitrogen) para as análises de microscopia confocal. As lâminas para microscopia óptica foram analisadas no microscópio óptico Axiophot (Carl Zeiss), equipado com objetivas de 40X/0.75 e 100X/1.3 de magnificação/abertura numérica e documentados com a câmera AxioCam MRc por meio do software AxioVisio versão 4.6.

Para as análises de microscopia de fluorescência os cruzamentos em microcultivo foram fixados em etanol 70% *overnight* e lavadas em tampão PBS 1X (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.144% Na₂HPO₄ e 0.024% KH₂PO₄) por três vezes. Em seguida as lâminas foram coradas por uma hora com Calcofluor (Diluição 10.000X - Sigma) para marcação de parede celular e SYBR Green I (Diluição 10.000X - Invitrogen) para marcação nuclear. Logo após a marcação as lâminas foram novamente lavadas três vezes em PBS1X e montadas adequadamente com meio apropriado (*mouting media* - gelatina em pó 16%, 0.015% de metiolato de sódio e 50% de v/v de glicerol 100%). As lâminas para microscopia confocal foram visualizadas no microscópio TCS SP5 II (Leica).

Resultados e Discussão

Identificação do locus *MAT* das espécies de *Paracoccidioides*

A primeira evidência da presença do locus *MAT* em *Paracoccidioides* foi relatada por Fernandes et al., (2005) que identificaram EST's (*Expressed Sequence Tag*) correspondente ao gene *MAT1-1* de *A. fumigatus* no transcriptoma de *P. lutzii* cepa Pb01. Os loci *MAT1-1* e *MAT1-2* de *Paracoccidioides* foram identificados por ferramentas de BLAST nos genomas de *P. brasiliensis* Pb18 e Pb3 e também no genoma de *P. lutzii*, baseados nas sequências dos genes α -box, HMG, *sla2*, *apn2* e *cox13* previamente descritos para *H. capsulatum*, *C. immitis* e *C. posadasii* (Fraser et al., 2007). De acordo com a **figura 2**, podemos observar que o isolado Pb01 possui o idiomorfo *MAT 1-1* enquanto que os isolados Pb18 e Pb3 possuem o locus *MAT1-2* em seus genomas. O gene α -box do isolado Pb01 tem uma fase aberta de leitura (ORF) de 1.311pb, produzindo uma proteína predita de 436 aminoácidos. Este gene é interrompido por um intron de 50 pb, conservado entre as demais espécies de fungos dimórficos e espécies de *Aspergillus*.

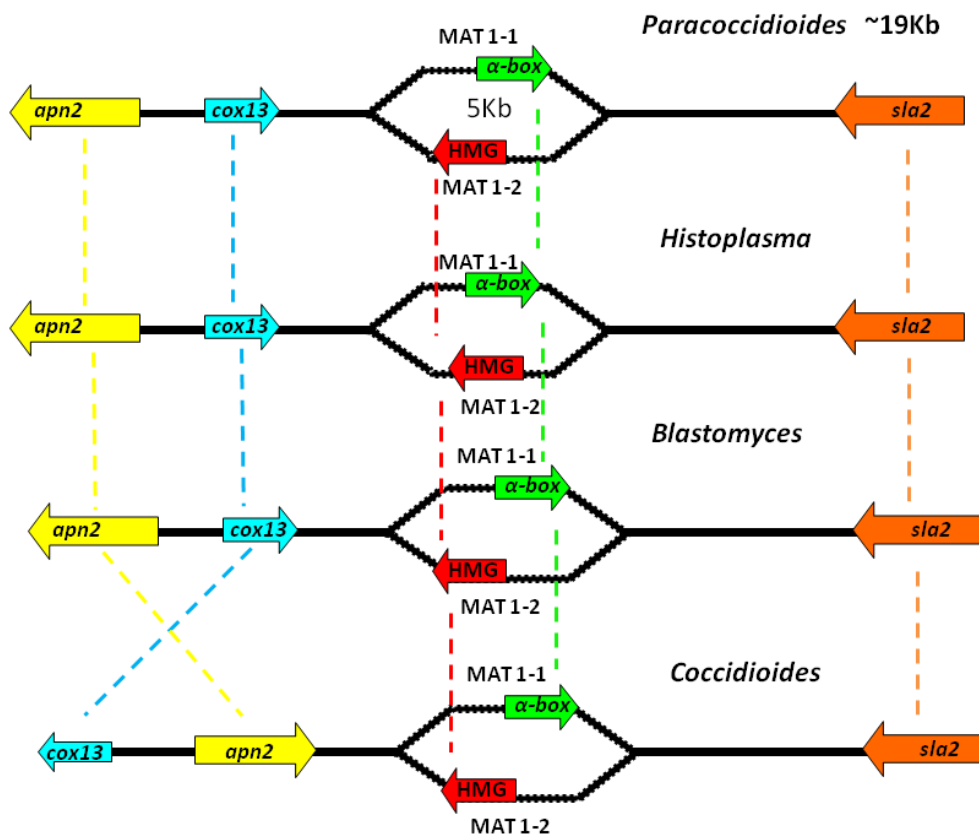


Figura 2. Representação esquemática do locus *MAT* de *Paracoccidioides* e demais fungos dimórficos da família Onygenaceae *strictu sensu*. O locus *MAT* de *Paracoccidioides* apresenta os genes dos fatores de

transcrição do tipo α -box (correspondente ao locus *MAT1-1*) e HMG (correspondente ao locus *MAT1-2*), condizente com os demais *Onygenales*. Os genes correspondentes ao locus *MAT* de *Paracoccidioides* estão em sintonia com os demais fungos analisados como representado pelos pontos que ligam os genes ortólogos em cada genoma estudado.

O gene HMG dos isolados Pb03/Pb18 possui uma fase aberta de leitura (ORF) de 990/1002 pb, produzindo uma proteína predita de 329/333 aminoácidos. Este gene é interrompido por dois introns sendo o primeiro de 47pb e o segundo com 51pb, conservados entre os isolados, demais espécies de fungos dimórficos e espécies de *Aspergillus*. Os genes que flanqueiam o locus *MAT 1-1* e *MAT 1-2* de *Paracoccidioides* são *apn2* e *sla2*, e a região entre estes dois genes possui um tamanho aproximado de 19kb ao longo do cromossomo. Estão em perfeita sintonia com os loci *MAT 1-1* e *MAT 1-2* de *H. capsulatum* e *B. dermatitidis*, entretanto possuem uma inversão gênica de *cox13* por *apn2* em uma das extremidades do locus, em relação a *C. immitis* (**Figura 2**). No período em que foi desenvolvida esta tese dois trabalhos relevantes quanto à reprodução sexuada de *Paracoccidioides* foram publicados: Li et al., (2010) caracterizam o locus *MAT* baseados nas sequências de fungos dimórfico e outros dermatófitos. Os autores observaram a presença de um elemento transponível tipo *POGO* no locus *MAT1-2* do isolado Pb18. Torres et al., (2010) também avaliaram a distribuição idiomórfica e expressão do locus *MAT* na população de *P. brasiliensis*. Além disso, os autores mostraram estruturas que se assemelham com ascósporos.

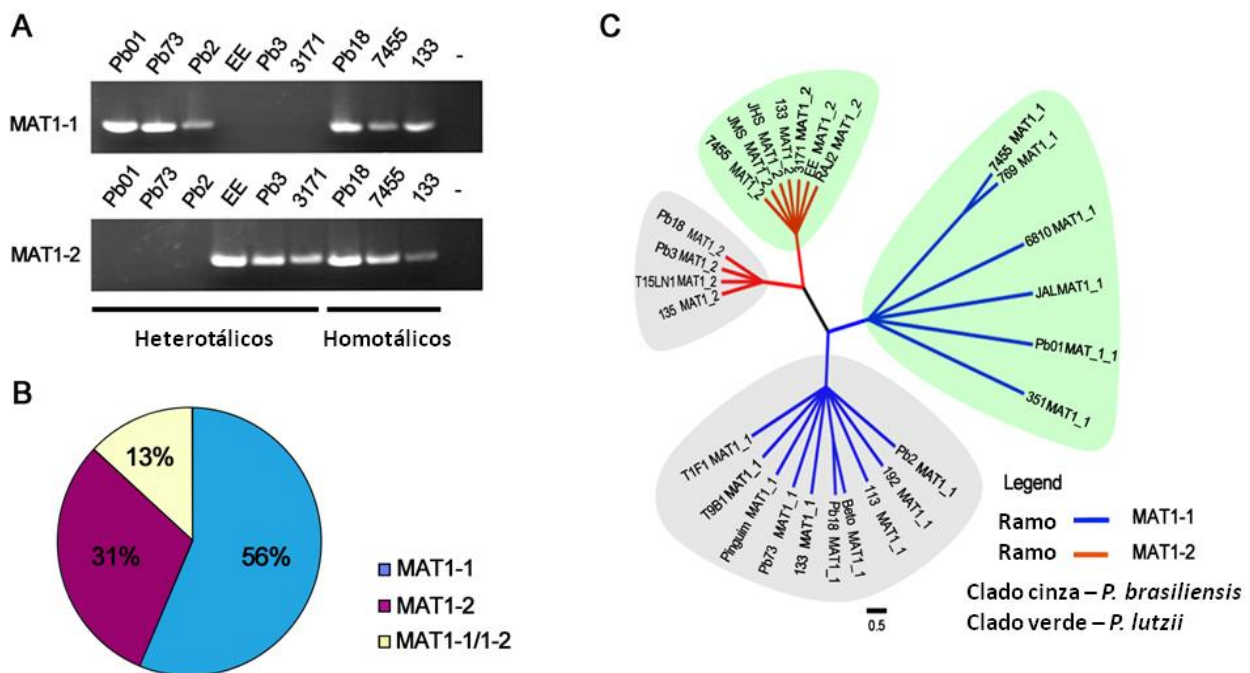


Figura 3: Amplificação, distribuição na população e análises filogenéticas dos locos *MAT* no complexo de espécies do gênero *Paracoccidioides*. (A) Identificação do idiomorfo sexual em isolados de *Paracoccidioides*

pela amplificação por PCR do locus *MAT1-1* e/ou revelando perfis homotáticos e heterotáticos. Distribuição idiomórfica de 98 isolados de *Paracoccidioides* mostrando: 56% de isolados *MAT1-1*, 31% de isolados *MAT1-2* e 13% de isolados possuindo ambos os loci *MAT1-1/MAT1-2*. (C) Filogenias sem raiz geradas pelo método de máxima parcimônia usando amplicons *MAT1-1* e *MAT1-2* sequenciados, o que permite a discriminação de *P. lutzii* (clados verdes) e *P. brasiliensis* (clados cinzas)

Baseado na sequência dos genes *MAT 1-1* e *MAT 1-2* foram desenhados oligonucleotídeos para avaliar a distribuição idiomórfica na população de 98 isolados do complexo de espécies do genero *Paracoccidioides*. De acordo com a **Figura 3A e 3B**, 55 isolados possuem o locus *MAT1-1* enquanto que 30 isolados *MAT1-2* como demonstrados nas bandas amplificada para um único alelo, sendo estes considerados heterotáticos. Inesperadamente 13 isolados tiveram ambos os alelos amplificados sendo considerados como possíveis homotáticos. De acordo com as amplificações, a prevalência das populações heterotáticas (*MAT1-1* e *MAT1-2*) e homotáticas é de 56%, 31% e 13% respectivamente, com uma razão aproximada de 4:2:1 (**Figura 3B**). Amplicons de 16 isolados *MAT1-1* e 11 *MAT1-2* foram selecionados para o sequenciamento e submetidas a análise filogenética. O cladograma do locus *MAT* revela claramente a separação sistemática de *P. lutzii* (clado verde - cepa tipo Pb01) de *P. brasiliensis* (clado cinza - cepa tipo Pb18), o que sustenta mais uma vez a proposta de duas espécies (**Figura 3C**). Estes dados foram importantes para discriminar os isolados de cada espécie de *Paracoccidioides* para os testes de cruzamentos. Vinte e um isolados de *P. lutzii* e vinte e quatro de *P. brasiliensis* previamente genotipados, foram analisados individualmente com intuito de conhecer a razão da distribuição do locus *MAT*. A razão encontrada nos isolados heterotáticos *MAT1-1* (12 isolados de *P. lutzii* e 16 de *P. brasiliensis*), *MAT1-2* (3 isolados de *P. lutzii* e 4 de *P. brasiliensis*), e isoaldos homotáticos (3 isolados de *P. lutzii* e 4 isolados de *P. brasiliensis*), considerando as duas espécies a parte foram 4:2:1 em *P. lutzii* e 4:1:1 para *P. brasiliensis*. Consideramos somente isolados ambientais coletados de tatus e também observamos uma distribuição idiomórfica similar: 4:2:1.

A presença de uma única cópia do gene de tipo sexual (*MAT1-1* ou *MAT1-2*) indica que as espécies de *Paracoccidioides* possuem um sistema bipolar de acasalamento (*mating*). A distribuição em espécies de fungos onde a reprodução sexual ocorre é frequentemente 1:1; Isto foi observado em *C. immitis*, *C. posadasii* (Mendel et al., 2007), *A. fumigatus* (Pöggeler, 2002; Rydholm et al., 2006) e, mais recentemente em *P. brasiliensis* (Torres et al., 2010). Em contraste Kwon-Chung et al., (1984), observaram uma alta prevalencia de isolados *MAT1-2* em isolados clínicos recuperados de pacientes com histoplasrose disseminada. Além disso, células do tipo α recuperadas do meio ambiente ou ambientais são de 30-40

vezes mais frequentemente encontradas do que as células a. O presente trabalho revela uma pequena predominância do locus *MAT1-1* na população de *Paracoccidioides*, mesmo considerando as espécies a parte ou mesmo isolados ambientais.

Identificação dos genes relacionados ao ciclo sexual nos genomas dos fungos dimórficos.

A grande maioria dos componentes da via de resposta a feromônios em fungos foram identificados por análises de genômica comparativa nos genomas dos fungos dimórficos *P. brasiliensis*, *P. lutzii*, *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *C. immitis* e *C. posadasii* (**Material suplementar 3**). Estes dados revelaram que o aparato genômico responsável pelo *mating* foi verticalmente transferido a partir de um genoma ancestral dos fungos patogênicos dimórficos. O ciclo sexuado já foi demonstrado "*in vivo*" e "*in vitro*" para os fungos *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* (McDonough e Lewis, 1967; Kwno-Chung, 1973; Kwno-Chung, 1975) e todos ortólogos foram identificados nos genomas de *Paracoccidioides*, sugerindo fortemente que o ciclo sexual também ocorra neste gênero. Ambos os receptores *ste2* e *ste3*, responsáveis pelo reconhecimento dos feromônios α e α respectivamente foram encontrados nos genomas de todos os fungos dimórficos. As moléculas de feromônios se ligam aos receptor acoplado a proteína G e estimulam a via das MAP cinases. A proteína G constitui-se de três subunidades: G_{α} , G_{β} e G_{γ} , as quais são designadas como Gpa1, Ste4 e Ste18 respectivamente, sendo todas as três identificadas no genoma. Nas leveduras, a ligação da molécula de feromônio ao seu receptor libera o complexo $G_{\beta\gamma}$ do seu inibidor G_{α} , que dispara o sinal inicial para o *mating* parando o ciclo celular em G1, seguido de polarização das células e *shmooing* (Expressão usada para configurar o local de encontro de duas leveduras de tipos sexuais opostos) (Fujimura, 1989; Bender & Sprague, 1986; Reed, 1991). Em *S. cerevisiae* e *C. albicans*, $G_{\beta\gamma}$ recruta a proteínas "scaffold" Ste5 para a membrana plasmática, e juntamente com ela são recrutadas as proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPK) Ste20, Ste11, Ste7 e Fus3 (Liao & Thorner, 1980; Qi & Elion, 2005). Nas leveduras, quando Fus3p é ativado por sua disassociação de Ste5, esta é translocada para o núcleo, ativando os genes de *mating*. Interessantemente o gene codificador da proteína Ste5 não foi encontrado em nenhum dos genomas dos fungos dimórficos. As buscas foram estendidas ao clado Pezizomycotina e ficou claro que este gene é exclusivo do clado Saccharomycotina. Fus3p, que é liberada no núcleo ativa Ste12p, o qual é requerido para ativação de genes específicos de *mating* e filamentação, incluindo a ativação das moléculas de feromônios (Wong & Dumas, 2010).

Nos Ascomycetes os genes de feromônio α codificam blocos de 2-5 peptídeos idêntico que são flanqueados por sítios de clivagem por Kex2 KR ou KK. Uma vez processados por Kex2 os peptídeos liberados (9-13 aminoácidos) são maturados pelas proteases Kex1 e Ste13 na membrana interna do complexo de Golgi e somente então são transportadas para o meio extracelular. Assim como o fator α , fator a é montado como uma sequência de aminoácidos precursora, mas é diferenciada por serem um molécula de cópia única. Em Ascomycetes a proteína precursora do fator a termina com o motivo Cys-alifático-alifático-X-COOH (CAAX box), o qual é um alvo para modificação lipídica. O primeiro evento de modificação desta molécula é a clivagem da cisteína localizada a jusante do CAAX box por Rce1 e Ste24 (proteases do tipo CAAX). Após este passo, duas proteínas conhecidas como Ram1 e Ram2 catalisam a adição de grupamentos prenil e, logo em seguida o grupo carboxil da cisteína é metilado por Ste14 metiltransferase. Estas modificações nos fatores a e α são indispensáveis para ligação nos seus receptores, garantindo a sinalização para o início do *mating* (Powers et al., 1986; Boyartchuk & Rine, 1998).

Foi possível ainda caracterizar o gene codificador do feromônio α de *P. brasiliensis*, *P. lutzii*, *H. capsulatum* e *B. dermatitidis*, em cooperação com o Prof. George Smulian na Universidade de Cincinnati - EUA (Figura 4). De acordo com o alinhamento na Figura 4A, a ORF correspondente ao gene precursor do feromônio α de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* possuem 229 pb e um intron de 97 pb, apresentando

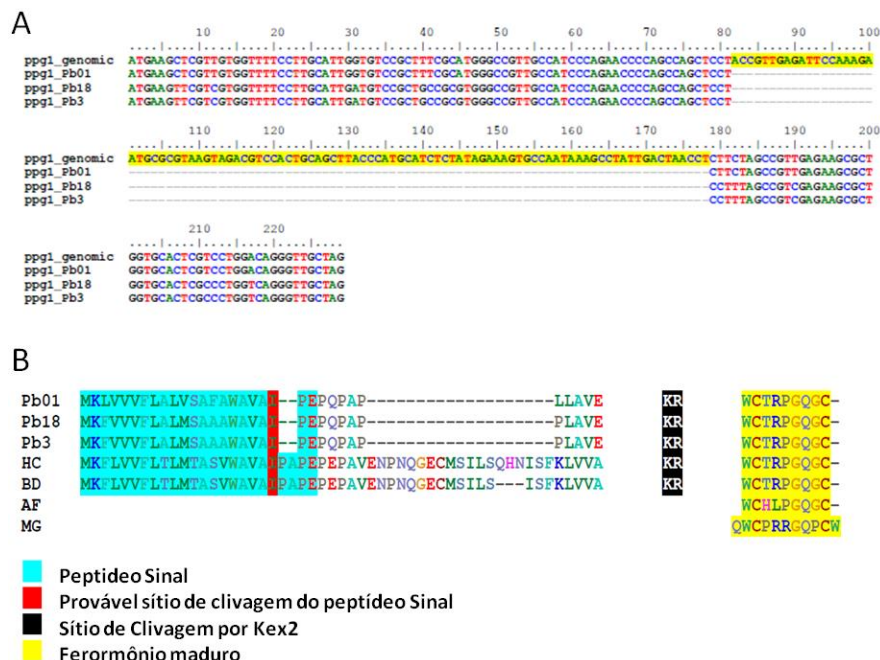


Figura 4. Caracterização genômica do gene precursor do feromônio α de *Paracoccidioides ppg1*. (A) Alinhamento da sequência genômica de *P. brasiliensis* Pb18 e Pb3 e *P. lutzii* Pb01 do gene ppg1 mostrando um intron de 97 pb destacado em amarelo. Alinhamento da proteína precursora do feromônio α predita para os fungos *P. lutzii*, *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* (HC) e *B. dermatitidis* (BD), destacando o peptídeo sinal,

sítio predito de clivagem do peptídeo sinal, sítio de clivagem por Kex2 e o peptídeo correspondente a feromônio maduro, mostrando similaridades com *Magnaphorthe grisea* (MG) e *Aspergillus fumigatus* (AF).

uma organização sintênica com os demais fungos patogênicos dimórficos. De acordo com a sequência proteica predita, esta molécula possui características marcantes de outros fungos como: peptídeo sinal indicado em azul, Sítio de clivagem por KEX2 e o peptídeo maduro conservado com *A. fumigatus* e *M. grisea* (**Figura 4B**). Entretanto, quando comparados os gêneros *Histoplasma*, *Blastomyces* e *Paracoccidioides* não é possível observar nenhum polimorfismo em nenhum dos 9 aminoácidos preditos como a molécula de feromônio. Além disto, a molécula madura do feromônio é apresentada em cópia única, não em blocos como é frequentemente observado nos Ascomycetes (Pöggeler, 2002; Martin et al., 2011). Isto significa que o feromônio produzido por *Paracoccidioides* teria o mesmo efeito no receptor de *H. capsulatum*? Isso levanta um ponto importante na evolução dos genes de *mating* nos fungos. Por exemplo, se isso ocorresse, poderia um feromônio de *P. lutzii* agir no receptor de *P. brasiliensis* e vice-versa, favorecendo a quimiotaxia entre indivíduos de diferentes espécies. Isso pode explicar a ocorrência de genótipos híbridos aqui relatados. O complexo de espécies de *Gibberella fujikuroi* também apresenta o mesmo peptídeo do feromônio α em 13 diferentes espécies, não sendo condizente com o processo de especiação. O processo de evolução mostra que os genes de feromônios estão sobre pressão de seleção positiva e diversificadora, entretanto os blocos de repetições dos peptídeos estão sobre seleção purificadora (Martin et al., 2011). Não podemos descartar que o mecanismo molecular de *mating* depende de diversos fatores como por exemplo genes envolvidos na cariogamia e meiose que regulam o ciclo sexual ou que podem agir de forma crucial no sucesso do *mating* nos fungos.

Análise da expressão dos genes de *mating* de *P. lutzii* e *P. brasiliensis* nas formas de micélio e levedura

A expressão de parte dos genes componentes da maquinaria de *mating* foi quantificada por PCR em tempo real nas fases de micélio e leveduras de cepas *MAT1-1* e *MAT1-2* de *P. lutzii* e *P. brasiliensis*. Os genes avaliados neste trabalho foram: os fatores transcricionais *MAT1-1* e *MAT1-2*, os receptores de feromônios *ste2* e *ste3*, a MAPK *fus3*, o fator transcricional *ste12* e o gene precursor do feromônio α *ppg1*. De acordo com os gráficos de expressão mostrados nas **figuras 5 A-G** os genes de toda a cascata de *mating* são expressos em todos isolados de ambos *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. De um modo geral observamos que a expressão dos genes avaliados é aumentada na forma miceliana, como esperado, uma vez que o

ciclo sexual dos membros da família Ajellomycetaceae ocorre na forma filamentosa (McDonough e Lewis, 1967; Kwno-Chung, 1973; Kwno-Chung, 1975, Sigler, 1996).

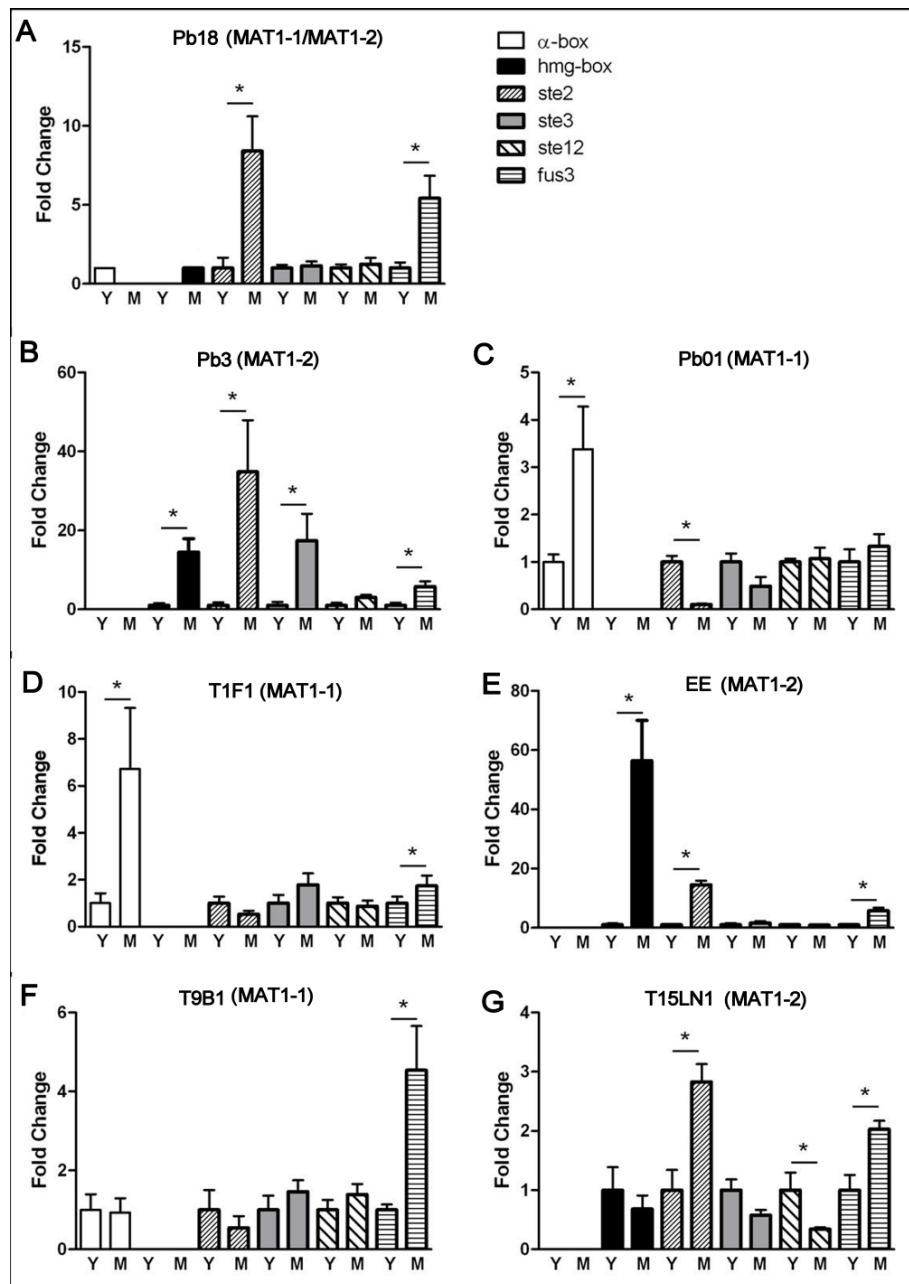


Figura 5. Análise quantitativa dos genes relacionados a via de sinalização de feromônio (α -box *MAT1-1*, HMG *MAT1-2*, receptores de feromônios *ste2* e *ste3*, a MAPK *fus3* e o ativador transcricional *ste12*). Os gráficos mostram a expressão relativa dos genes relacionados ao sexo inferida por PCR em tempo real das cepas Pb18(A), Pb3 (B), T1F1 (D), T9B1 (F) e T15LN1 (G) de *P. brasiliensis* e as cepas Pb01 (B) e EE (E), nas formas miceliana (M) e leveduriforme (Y). As barras com * mostram que a expressão de um determinado gene é diferencial entre as duas formas do fungo de cada isolado analisado. Como gene controle foi utilizado o α -tubulina.

É importante frizar que os genes *MAT1-1* e *MAT1-2* são expressos somente nos tipos sexuais heterotáticos correspondentes. O isolado Pb18 que foi considerado nas análises de tipagem idiomórfica como homotático (ver **Figura 5A**) possui uma expressão diferencial do locus *MAT*, o gene *MAT1-1* é expresso somente na fase leveduriforme enquanto que o gene *MAT1-2* é expresso somente na fase miceliana. O gene da MAPK *fus3* foi diferencialmente expresso em seis de sete isolados analisados. Este gene foi descrito como importante para manutenção da forma filamento (saprófitica) do fungo sendo importante para reprodução sexuada. Não diferentemente, a expressão do gene precursor do feromônio α *ppg1* foi significamente maior na fase miceliana dos isolados analisados (**Figura 6**). Estes genes são importantes para a processo de quimiotaxia entre células de tipo sexuais opostos, como observado para *S. cerevisiae* e *H. capsulatum* (Sengupta & Cochran, 1991; Bubnick & Smulian, 2007). É interessante ressaltar que este gene é expresso em ambas as cepas *MAT1-1* e *MAT1-2* como também descrito para *C. albicans* e *C. neoformans*. Já na levedura *S. cerevisiae* cada feromônio é expresso em cada tipo sexual respectivo, por isso a designação de células α ou α . Além disto, buscamos no transcrito do isolado de *P. lutzii* Pb01 EST's correspondentes ao gene *ppg1* nas bibliotecas de micélio e levedura. Foram encontrados 503 clones de cDNA sequenciados, correspondentes ao gene *ppg1*, todos na biblioteca da forma miceliana, mostrando a grande especificidade da fase filamentososa do fungo. Estes 503 clones do gene *ppg1* correspondem a 5% do transcrito total, totalizando aproximadamente 15% dos clones sequenciados da forma miceliana. Este alto número de cópia de transcritos relativos ao gene *ppg1* na forma miceliana pode estar relacionado ao fato deste gene possuir apenas uma cópia do peptídeo, precisando ser altamente expresso nesta condição. Neste trabalho mimetizamos a indução por feromônio co-cultivando as células *MAT1-1* e *MAT1-2* de *P. brasiliensis*. O sobrenadante coletado do co-cultivo das cepas T9B1 (*MAT1-1*) e T15LN1 (*MAT1-2*) após 21 dias foi colocado em contato por 24 horas com células micelianas dos mesmos isolados crescidos individualmente. Imediatamente após este período, o RNA das células foi extraído, os transcritos dos genes acima citados foram também quantificados e mostraram uma maior expressão após o estímulo do sobrenadante (**Figura 7**).

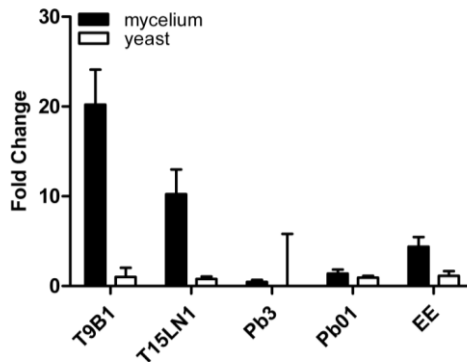


Figura 6. Análise da expressão relativa do gene precursor do feromônio α *ppg1* nas cepas de *P. brasiliensis* T9B1, T15LN1 e Pb3 e *P. lutzii* cepas Pb01 e EE. A expressão dos genes foi avaliada nas formas miceliana e leveduriforme dos fungo.

É conhecido que o co-cultivo de células fúngicas de tipos sexuais opostos em meio de cultura com pouca fonte de carbono induz a produção de feromônio α e α (Sengupta & Cochran, 1991; Bubnick & Smulian, 2007). Deste modo podemos interpretar que as células miceliana de *P. brasiliensis* são capazes de sentir e responder ao sobrenadante contendo o feromônio aumentando a expressão dos genes da cascata sinalização de *mating*.

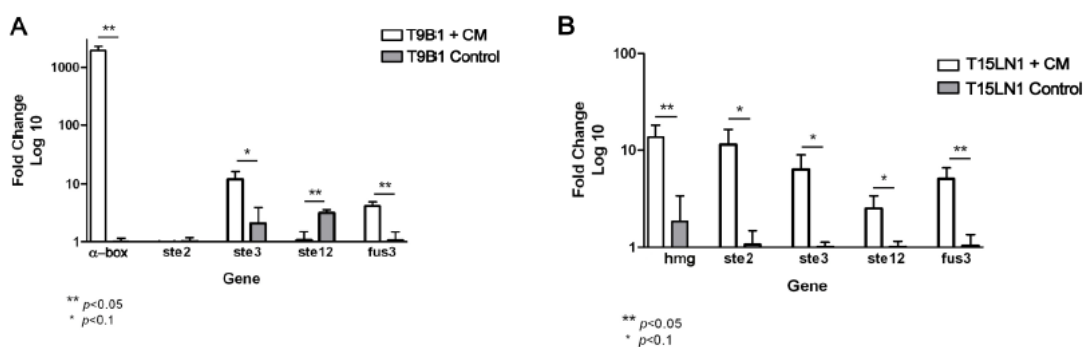


Figura 7. Estimulação mediada por feromônio após o contato com meio condicionado (CM) de células de *P. brasiliensis* T9B1 - *MAT 1-1* and T15LN1 - *MAT1-2* co-cultivadas por 21 dias. Os níveis de mRNA dos genes relacionados a reprodução sexual α -box *MAT1-1*, HMG *MAT1-2*, receptores de feromônios *ste2* e *ste3*, MAPK *fus3* e o fator transcricional *ste12* foram avaliados nos isolados T9B1 (A) e T15LN1 (B), após

24 h de contato com CM. Como controle negativo as células foram cultivadas em meio YEM no mesmo tempo e condições experimentais que o CM.

Cruzamentos "*In vitro*" de células micelianas de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*

A co-incubação de isolados *MAT1-1/MAT1-2* de *P. brasiliensis* (S1) e de *P. lutzii* revelaram a presença de estruturas chamadas de ascocarpos jovens (**Figura 8, Tabela 3**). Estas estruturas foram também observadas em *H. capsulatum* e *B. dermatitidis* e foram relacionadas ao processo inicial do ciclo sexual da família Ajellomycetacea (McDonough e Lewis, 1967; Kwno-Chung, 1973; Kwno-Chung, 1975, Sigler, 1996, Bubnick & Smulian, 2007).

Tabela 3. Experimentos de *mating* entre e isolados de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Os isolados utilizados em cada par de cruzamentos e formação de ascocarpos jovens (Frequência de observação de hifas enoveladas estão indicados em cada coluna).

Isolados	Formação de Ascocarpo Jovem*
Experimentos de <i>mating</i> em <i>P. lutzii</i>	
JAL X EE	+++
66 X EE	++
8334 X EE	+
ED01 X PLRO1	++
Pb01 X EE	-
Experimentos de <i>mating</i> em <i>P. brasiliensis</i>	
T1F1 X T15LN1	+++
T9B1 X T15LN1	+++
Pb2 X Pb3	-
Pb4 X Pb3	-
Pb18 X T9B1	-
Experimentos de <i>mating</i> usando <i>P. lutzii</i> X <i>P. brasiliensis</i>	
T1F1 X EE	-
JAL X T15LN1	-

* +++, mais de 25 hifas enoveladas por lâmina; ++, 11-24 hifas enoveladas por lâmina; + até 10 hifas enoveladas por lâmina; - nenhuma estrutura observada;

As hifas espiraladas que são características do processo inicial de *mating* foram observadas nos cruzamentos entre T1F1 X T15LN1 e T9B1 X T15LN1 em *P. brasiliensis* (**Figura 8 A-F**). Em *P. lutzii*, as hifas espiraladas foram também observadas nos isolados pareados JAL X EE, 66 X EE e PLRO1 X ED01 (**Figura 8 G-J**). As pontas de hifas não diferenciadas sexualmente começam a enovelar umas nas outras

formando múltiplos círculos após dois meses de co-cultivo (**Figuras 8A e 8G**). As hifas ficam mais constrictas umas as outras e o número de círculos aumenta após 4-6 meses de cocultivo (**Figura 8B e 8F**). Na **Figura 8J** inúmeras hifas helicoidais são observadas no campo no cruzamento das cepas de *P. lutzii* 66XEE. Nenhuma diferença morfológica foi observada nas estruturas sexuais produzidas, por *P. lutzii* ou por *P. brasiliensis*. As estruturas sexuais foram observadas nos três meios selecionados para os experimentos de *mating*; OTA, V8 e SEA. Os experimentos de *mating* usando isolados Pb2 X Pb3 e Pb4 X Pb3 da espécie filogenética de *P. brasiliensis* PS2 ou envolvendo o putativo isolado homotático Pb18, não produziram nenhuma hifa espiralada, sendo este um indicativo de ausência de estruturas sexuais (Ver **Tabela 3**). Nenhum cleistotécio maduro foi observado em nenhum dos cruzamentos analisados neste trabalho, mesmo naqueles experimentos que foram mantidos até 8 meses de co-incubação. As cepas padrões Pb18 de *P. brasiliensis* e Pb01 de *P. lutzii* não produziram nenhuma estrutura relacionada ao ciclo sexual. Isto se deve muito provavelmente ao longo tempo em que estas cepas foram mantidas em cultura. Isso é comumente observado nas cepas de *H. capsulatum* que perdem a habilidade de produzir cleistotécios quando mantidas em culturas por um longo tempo (Kwon-Chung, 1973; Kwon-Chung 1975; Bubnick & Smulian, 2007). Apesar de terem sido detectados elevados níveis de transcritos possivelmente relacionados ao ciclo sexual em algumas cepas nenhuma correlação foi observada entre o nível de expressão e habilidade de produzir ascocarpos jovens.

O presente estudo mostra pela primeira vez estruturas relacionadas ao estágio inicial do processo de *mating* nas espécies do gênero *Paracoccidiodes*. As agregações de hifas enveladas fazem parte do processo inicial de reprodução sexuada observada para os fungos *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *Emmonsia* ssp., *A. fumigatus*, *A. nidulans* and *T. mentagrophytes*, para os quais o ciclo sexual já foi definido (McDonough & Lewis, 1967, Kwon-Chung, 1973, Ajello & Cheng, 1967, Sigler, 1996; O'Gorman et al., 2009; Große & Krappmann, 2008)

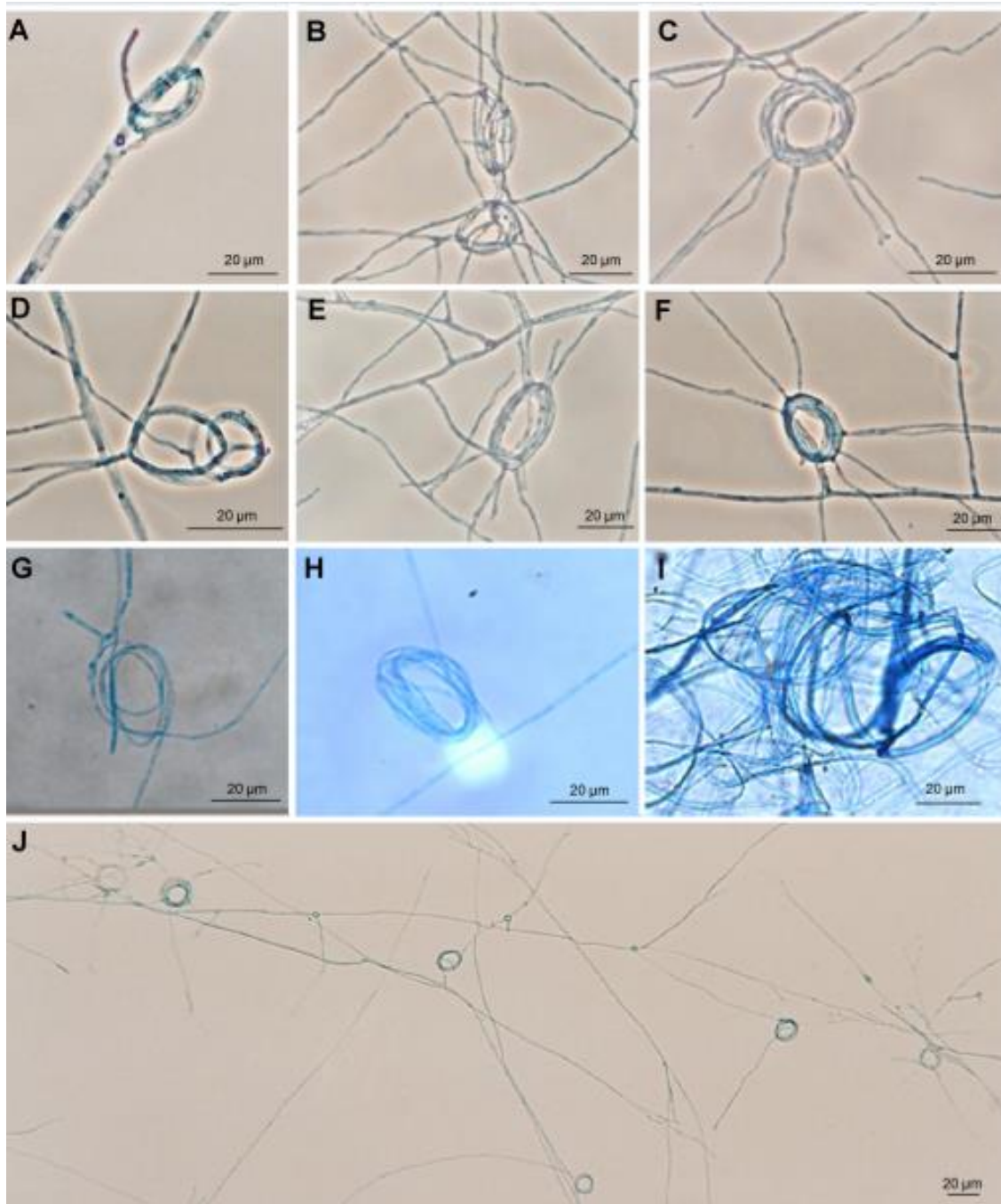


Figura 8. Estágios iniciais do desenvolvimento da fase sexual nas espécies de *Paracoccidioides*. As estruturas sexuais foram obtidas por cruzamentos em par por isolados de tipos sexuais opostos em meio de cultura V8, SEA e OTA e acompanhados por 8 meses. As descrições a seguir de cada painel são acompanhadas das seguintes informações: Isolados pareados, tempo de incubação (meses - m), meio de cultura utilizado e magnificação. A) T9B1 X T15LN1, 2m, SEA, 400X, B) T9B1 X T15LN1, 4m SEA, 400X, C) T9B1 X T15LN1, 4m, SEA, 400X, D) T9B1 X T15LN1, 6m, SEA, 400X, E) T1F1 X T15LN1, 4m, SEA, 400X, F) T1F1 X T15LN1, 6m, SEA, 400X G) ED01 X PLRO1, 2m, OTA, 400X, H) ED01 X PLRO1, 4m OTA, 400X I) 66 X EE, 6m OTA, 400X, J) 66 X EE, 4m, v8, 100X.

As hifas enveladas foram detectadas após dois meses dos experimentos de *mating* em ambas espécies do gênero *Paracoccidioides* o que de fato é o primeiro passo do processo de ascogênese de *H. capsulatum* e *A. fumigatus* (Kwon-Chung, 1973; O'Gorman et al., 2009). O fato de não ter sido observado nenhum cleistotécio mesmo após 8 meses de incubação pode estar relacionados a diversos fatores físicos ou químicos como: 1 - Feromônios sintéticos poderiam ser adicionados ao meio de cultura para facilitar a quimiotaxia. 2- Os fungos foram mantidos no escuro e alguns fungos precisam de foto-periodismo alternando 12 horas de luz e 12 horas no escuro para produzirem cleistotécios maduros. 3 - Todos os isolados utilizados neste trabalho estavam em cultura há pelo menos 2 anos, o que pode ter contribuído para a perda da capacidade de produzir cleistotécios maduros, como observado em *H. capsulatum*.

Heterotalismo em *Paracoccidioides*: Populações heterotáticas mistas ou de fato existe?

Homotalismo é uma característica comum a uma grande parcela da população dos fungos, onde um indivíduo carrega em seu genoma os dois locus *MAT*, podendo então entrar em ciclo sexuado. Nas espécies de *Aspergillus* o homotalismo parece ser uma característica ancestral e o heterotalismo foi adquirido após a divergência e expansão deste gênero. O mesmo também foi observado nos gêneros filogeneticamente próximos *Cochliobolus* e *Stemphylium*. Neste trabalho mostramos a possibilidade de homotalismo pela primeira vez na família Ajellomycetaceae, que engloba os fungos dimórficos patógenos humanos. Mostramos em 13 isolados de *Paracoccidioides* que eles apresentavam ambos os locus *MAT* em seus genomas por meio de amplificações por PCR do locus *MAT* (**Figura 3A**). Análises filogenéticas do locus *MAT* agruparam os isolados Pb18 e 7455 com suas respectivas espécies *P. brasiliensis* S1 e *P. lutzii* entretanto o isolado 133 alterna sua posição filogenética entre *P. brasiliensis* e *P. lutzii* dependendo do locus (*MAT1-1* ou *MAT1-2*) analisado (**Figura 3C**). Estes dados estão de acordo com recentes trabalhos que mostram que este isolado e outros podem ser híbridos ou carregarem ainda polimorfismos ancestrais (Teixeira et al., 2009). Considerando estes dados, podemos inferir que o gênero *Paracoccidioides* ou pelo menos seu ancestral seja homotático. Outro aspecto importante é que na espécie homotática ambos *MAT1-1* e *MAT1-2* são co-expressos em condições "*in vitro*" (Paoletti et al., 2005). Ao contrário dos resultados encontrados para *A. nidulans*, a expressão do locus *MAT* no isolado putativo homotático Pb18 é diferencial; O gene α -box é expresso somente na condição de levedura enquanto que o gene HMG é expresso somente na condição de micélio mostrando uma expressão diferencial deste gene (**Figura 5A**). Outra possível explicação para os isolados homotáticos seria possuir genomas híbridos. De acordo com os estudos de

Teixeira et al., (2009) e no presente estudo, mostramos que os isolados 133, 769, MS1, MS2 e 5979 podem constituir genomas híbridos uma vez que não são isolados concordantes em suas genealogias. Então as cepas não seriam verdadeiros homotáticos, mas sim produtos fusionados intraespécies ou interespecies de acasalamento entre cepas *MAT1-1* e *MAT1-2*. Estes isolados particularmente estão parados no estado híbrido provavelmente devido à inabilidade de entrar em meiose, consistente com a especiação. No Basidiomycete *C. neoformans* o sorotipo AD, que é considerado uma variedade ou híbrido interespecífico não entra em meiose devido a divergência genética, permanecendo no estado diplóide (Lin et al., 2006; Lin et al., 2007).

A ploidia de *Paracoccidioides* já foi inferida por diferentes métodos levando a conclusões controversas. Análises de microfluorimetria nuclear combinadas com análises de eletroforese em gel de campo pulsado (Cano et al., 1998; Feitosa et al., 2003; Montoya et al., 1999; Montoya et al., 1997) revelaram que o tamanho dos genomas de *Paracoccidioides* variam de 23 a 31Mb e os ensaios de microfluorimetria mostraram um conteúdo genômico de 46-61 Mb, mostrando que a ploidia de leveduras de *P. brasiliensis* pode ser haplóide, diplóide ou até aneuplóide (Cano et al., 1998; Feitosa et al., 2003). Também foram realizados ensaios de ploidia em *P. brasiliensis* combinando citometria de fluxo e tamanho de genoma baseado em eletroforese em gel de campo pulsado, revelando que *P. brasiliensis* é haplóide ou pelo menos aneuplóide (Almeida et al., 2007). Outra possível explicação para amplificação de ambos idiomorfos sexuais em *Paracoccidioides* é que estes isolados constituem populações mistas de isolados heterotáticos. Esta consideração não deve ser descartada, entretanto o isolado Pb18 que temos em cultura foi obtido de isolamento de colônias simples sugerindo um único genótipo. Uma vez que diferentes estados de ploidia foram identificados em *P. brasiliensis* o homotalismo nestas espécies deve ser investigado a fundo.

Conclusão

Com o aumento de informações advindas do sequenciamento dos genomas dos fungos, diversas questões a respeito da biologia e evolução destes microrganismos vêm sendo respondidas. Combinando a genômica estrutural e funcional juntamente com experimentos de *mating* nós mostramos direta e indiretamente que o ciclo sexual de *Paracoccidioides* deve ocorrer em seu nicho natural, muito provavelmente durante seu estado saprofítico de vida. Os componentes da via de sinalização celular do feromônio foram bem caracterizadas em *S. cerevisiae* (Schrack et al., 1997), *N. crassa* (Shiu & Glass, 2000)

e *A. fumigatus* (Pöggeler, 2002), o que possibilita a busca destes genes em outros fungos. Neste trabalho nós identificamos todos os ortólogos responsáveis pela maquinaria de *mating* em *C. immitis* e *C. posadasii* (**Anexo 3**), entretanto o ciclo sexual destas espécies ainda não foi descoberto. É bem conhecido que existe especiação críptica neste gênero (Fisher et al., 2003), processos de recombinação nas populações identificadas (Barker et al., 2007) e foi observado que a razão da distribuição idiomórfica do locus *MAT1-1/MAT1-2* é 1:1 sustentando a existência de ciclo sexual no gênero *Coccidioides*. O fungo patógeno humano *A. fumigatus* foi considerado assexual desde sua descoberta, entretanto O'gorman et al., (2009) demonstraram a existência de ciclo sexual nesta espécie. Através de comparações genômicas entre *A. fumigatus* e *S. cerevisiae* foi mostrado que este patógeno possui a maquinaria de *mating* (Pöggeler, 2002), e este fato foi relatado na literatura antes da descoberta do ciclo sexual deste patógeno. Nem todas espécies do gênero *Aspergillus* são sexuadas entretanto *A. fumigatus* é considerado filogeneticamente como táxon irmão de *Neosartorya fischeri*, sendo esta uma espécie homotática e com ciclo sexual bem conhecido. Outro exemplo é o fungo *Trichophyton rubrum* que foi considerado assexual até que sua maquinaria genômica relacionada ao ciclo sexual foi descrita (Li et al., 2009) e mais tarde se confirmou via de experimentos de *mating* ser potencial em fazer o ciclo sexuado (Anzawa et al., 2010). Estes exemplos acima citados mostram a grande importância dos estudos evolutivos e genômicos para o entendimento da biologia e do ciclo de vida de um microrganismo.

Referências bibliográficas

- Ajello L, Cheng SL. 1967. The perfect state of *Trichophyton mentagrophytes*. *Sabouraudia*. 4:230-234.
- Almeida FP. 1930. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasita brasileiro. *Fac Med Univ São Paulo* 5:125-141.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang 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
- Andrade ALSS, 1983. Paracoccidioidomicose linfático-abdominal. Contribuição ao seu estudo. *Rev Pat Trop* 12:165-256.

- Anzawa K, Kawasaki M, Mochizuki T, Ishizaki H. 2010. Successful mating of *Trichophyton rubrum* with *Arthroderma simii*. *Med. Mycol.* 48(4):629-634
- Bagagli E, Bosco SM, Theodoro RC, Franco M. 2006. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Genet Evol.* 6(5):344-51.
- Bagagli E, Franco M, Bosco SM, Hebler-Barbosa F, Trinca LA, Montenegro MR. 2003. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med. Mycol.* 41, 217–223.
- Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquati S, Miyaji M, de Camargo ZP, Gomes GM, Franco M, Montenegro MR. 1998. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58, 505–512.
- Barbosa W, Daher R, Oliveira AR. 1968. Forma linfático abdominal da blastomicose sul-americana. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 10:16-27
- Barker BM, Jewell KA, Kroken S, Orbach MJ. 2007. The population biology of *coccidioides*: epidemiologic implications for disease outbreaks. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1111:147-163.
- Barker BM, Wendel C, Galgiani JN, Orbach MJ. Thermotolerance differences between species of *Coccidioides* allow development of an assay for species delineation. *Mycologia In press*
- Batista Jr J, de Camargo ZP, Fernandes GF, Vicentini AP, Fontes CJ, Hahn RC, 2010. Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis? *Mycoses. Mycoses.* 1;53(2):176-80.
- Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ. 2001. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 13:248-252.

- Bender A, Sprague GF Jr. 1986. Yeast peptide pheromones, a-factor and a-factor, activate a common response mechanism in their target cells. *Cell* 47:929-937
- Birney E, Clamp M, Durbin R. 2004. GeneWise and Genomewise. *Genome Res* 14: 988-995.
- Bonfim CV, Mamoni RL, Souza MH, Blotta L. 2009. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.*:1-12.
- Borodovsky M, Lomsadze A, Ivanov N, Mills R. 2003. Eukaryotic gene prediction using GeneMark.hmm. *Curr Protoc Bioinformatics Chapter 4: Unit4* 6.
- Boyartchuk VL, Rine J. 1998. Roles of prenyl protein proteases in maturation of *Saccharomyces cerevisiae* a-factor. *Genetics*.150(1):95-101.
- Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev.* 6: 89-117.
- Bubnick M, Smulian AG. 2007. The *MAT1* locus of *Histoplasma capsulatum* is responsive in a mating type-specific manner. *Eukaryot. Cell* 6:616-621.
- Bustamante-Simon B, McEwen JG, Tabares AM, Arango M, Restrepo-Moreno A. 1985. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia.*;23(6):407-14
- Calich VL, da Costa TA, Felonato M, Arruda C, Bernardino S, Loures FV, et al. 2008. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia.* 165:223-36.
- Calich VL, Kashino SS. 1998. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res* 31: 615-623
- Calvi SA, Peraçoli MT, Mendes RP, Marcondes-Machado J, Fecchio D, Marques SA, et al. 2003. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect.* 5:107-113

- Cano MI, Cisalpino PS, Galindo I, Ramírez JL, Mortara RA, da Silveira JF. 1998. Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol.* 36(3):742-7
- Cardoso MA, Tambor JH, Nobrega FG. 2007. The mitochondrial genome from the thermal dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast* 24: 607-616.
- Carrero LL, Niño-Vega G, Teixeira MM, Carvalho MJ, Soares CM, Pereira M, Jesuíno RS, McEwen JG, Mendoza L, Taylor JW, Felipe MSF, San-Blas G. 2008. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal. Genet. Biol.* 45, 605–612
- Carvalho KC, Ganiko L, Batista WL, Morais FV, Marques ER, et al. 2005. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype. *Microbes Infect* 7: 55-65
- Corredor GG, Peralta LA, Castaño JH, Zuluaga JS, Henao B, Arango M, Tabares AM, Matute DR, McEwen JG, Restrepo A. 2005. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Med. Mycol.* 43, 275–280.
- Cox RA, Magee DM. 2004. Coccidioidomycosis: Host response and vaccine development. *Clinical Microbiology Reviews.* 17: 804-839.
- Daboussi MJ, Capy P. 2003. Transposable elements in filamentous fungi. *Annu Rev Microbiol* 57: 275-299.
- Daboussi MJ. 1997. Fungal transposable elements and genome evolution. *Genetica.* 100(1-3):253-260
- De Camargo ZP. 2008. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 165(4-5):289-302.

- Desjardins CA, Champion MD, Holder JW, Muszewska A, Goldberg J, Bailão AM, Brigido MM, Ferreira ME, et al., 2011. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. *PLoS Genet.* 2011 Oct;7(10):e1002345
- Durlacher R, Lima SD. Ações da Agência de Vigilância em Saúde em Relação à Paracoccidioidomicose (PCM) – Rondônia. *Manuscript under preparation.*
- Felipe MSS, Andrade RV, Arraes FB, Nicola AM, Maranhão AQ, Torres F, Silva-Pereira I, Pocas-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LMP, et al., 2005. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in Mycelium and Yeast Cells. *J Biol Chem.* 280: 24706–14
- Fernandes L, Araújo MAM, Amaral A, Reis VCB, Martins NF, Felipe, M.S. 2005. Cell signaling pathways in *Paracoccidioides brasiliensis*: inferred
- Fisher MC, Koenig GL, White TJ, San-Blas G, Negroni R, Wanke B, Alvarez G, Taylor JW. 2001. Biogeographic range expansion into south america by *Coccidioides immitis* mirrors new world patterns of human migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98(8): 4558-4562.
- Fisher MC, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. 2000. A test for concordance between the multilocus genealogies of genes and microsatellites in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Molecular Biol Evol* 17: 1164-1174.
- Fisher MC, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. 2002. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non- California population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia* 94(1): 73-84.
- Franco M, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. 1994. Paracoccidioidomycosis. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Fraser JA, Stajich JE, Tarcha EJ, Cole GT, Inglis DO, Sil A, Heitman, J. 2007. Evolution of the mating type locus: insights gained from the dimorphic primary fungal pathogens *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, and *Coccidioides posadasii*. *Eukaryot Cell.* 6(4):622-9.

- Fujimura HA. 1989. The yeast G-protein homolog is involved in the mating pheromone signal transduction system. *Mol. Cell Biol.* 9(1): 152-158.
- Große V, Krappmann S. 2008. The asexual pathogen *Aspergillus fumigatus* expresses functional determinants of *Aspergillus nidulans* sexual development. *Eukaryot. Cell* 7: 1724-1732
- Haas BJ, Delcher AL, Wortman JR, Salzberg SL. 2004. DAGchainer: a tool for mining segmental genome duplications and synteny. *BioinformaticS* 20: 3643-3646.
- Hahn RC, Macedo AM, Fontes CJF, Batista RD, Santo NL, Hamdan JS. 2003. Randomly amplified polymorphic DNA as a valuable tool for epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis* *J Clin Microbiol.* 41(7):2849-54.
- Hahn RC, Macedo AM, Santos NL, Resende JCP, Hamdan JS. 2002. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* atypical isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. *Rev. Iberoam. Micol.* 19:49–51
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98
- Hawksworth DL. 2002. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res*, 105(12):1422-1432.
- Hebeler-Barbosa F, Morais FV, Montenegro MR, Kuramae EE, Taylor JW, Montes B, McEwen JG, Puccia R, Bagagli E. 2003. Sequence comparison of the internal transcribed spacer regions and gp43 in *Paracoccidioides brasiliensis* for patients and armadillos *Dasypus novemcinctus*. *J. Clin. Microbiol.* 41:5735-5737.
- Heitman J, Kronstad JW, Taylor JW, Casselton LA. 2007. Sex in Fungi: Molecular Determination and Evolutionary Implications. American Society for Microbiology Press
- Heitman J. 2006. Sexual reproduction and the evolution of microbial pathogens. *Curr. Biol.* 16(17):711-725.

- Herr RA, Tarcha EJ, Taborda PR, Taylor JW, Ajello L, Mendoza L. 2001. Phylogenetic analysis of *Lacazia loboi* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic *Onygenales*. *J Clin Microbiol*; 39: 309-314.
- Hillis DM, Bull JJ. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetics analysis. *Syst. Biol.* 42, 182–192.
- Jaffe DB, Butler J, Gnerre S, Mauceli E, Lindblad-Toh K, et al. 2003. Whole-genome sequence assembly for mammalian genomes: Arachne 2. *Genome Res* 13: 91-96.
- Jones MD, Forn I, Gadelha C, Egan MJ, Bass D, Massana R, Richards TA. 2011. Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. *Nature.* 11;474(7350):200-203
- Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, Klonowski P, Kohany O, et al. 2005. Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenet Genome Res* 110: 462-467.
- Kapitonov VV, Jurka J. 2008. A universal classification of eukaryotic transposable elements implemented in Repbase. *Nat Rev Genet* 9: 411-412; author reply 414.
- Kasuga T, Taylor JW, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castañeda E, Lacaz CS, Heins-Vaccari, EM, de Freitas , Zancopé-Oliveira RM, Qin Z, Negroni R, et al., 2003. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol* 12: 3383-3401.
- Kasuga T, Taylor JW, White TJ. 1999. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *Journal of Clin Microbiol*, 37, 653–663.
- Klein BS, Tebbets B. 2007. Dimorphism and virulence in fungi. *Curr Op Microbiol.* 10 (4) 314-319
- Koufopanou V, Burt A, Taylor JW. 1997. Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5478–5482.

- Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, et al. 2004. Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol* 5: R12
- Kwon-Chung KJ, Bartlett MS, Wheat LJ. 1984. Distribution of the two mating types among *Histoplasma capsulatum* isolates obtained from an urban histoplasmosis outbreak. *Sabouraudia* 22(2):155-7.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE. 1992. *Medical Mycology*. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Kwon-Chung KJ. 1973. Studies on *Emmonsia capsulata*. I. Heterothallism and development of the ascocarp. *Mycologia* 65:109–121.
- Kwon-Chung KJ. 1975. Perfect state (*Emmonsia capsulata*) of the fungus causing large-form African histoplasmosis. *Mycologia* 67:980–990.
- Leão RC, Mendes E. 1980. Paracoccidioidomycosis, neoplasia and associated infections. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 8(3):185-8.
- Li W, Metin B, White TC, Heitman J. 2010. Organization and evolutionary trajectory of the mating type (MAT) locus in dermatophyte and dimorphic fungal pathogens. *Eukaryot Cell* 9: 46-58.
- Liao H, Thorner J. 1980. Yeast mating pheromone e factor inhibits adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:1898-1902
- Lin X, Huang JC, Mitchell TG, Heitman J. 2006. Virulence attributes and hyphal growth of *C. neoformans* are quantitative traits and the MAT α allele enhances filamentation. *PLoS Genet*. 2:e187.
- Lin X, Litvintseva AP, Nielsen, KS, Floyd A, Mitchell TG, Heitman J. 2007 alpha AD alpha hybrids of *Cryptococcus neoformans*: evidence of same-sex mating in nature and hybrid fitness. *PLoS Genet* 3: 1975-1990.

- Loytynoja A, Goldman N. 2005. An algorithm for progressive multiple alignment of sequences with insertions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:10557-10562.
- Lutz A. 1908. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. *Brasil Med* 22:121-41
- Lutzoni F, Kauff F, Cox C, McLaughlin D, Celio G, Dentinger B, Padamsee M, Hibbett D, James T, Baloch E, *et al.* 2004. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits 1. *Am J Bot*, 91(10):1446-1480.
- Mandel MA, Barker BM, Kroken S, Rounsley SD, Orbach MJ. 2007. Genomic and population analyses of the mating type loci in *Coccidioides* species reveal evidence for sexual reproduction and gene acquisition. *Eukaryot. Cell* 6:1189–1199
- Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. 2007. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol.* 45(10):3198-3206.
- Marini MM, Zanforlin T, Santos PC, Barros RR, Guerra AC, *et al.* 2010. Identification and characterization of Tc1/mariner-like DNA transposons in genomes of the pathogenic fungi of the *Paracoccidioides species* complex. *BMC Genomics* 11: 130.
- Martin SH, Wingfield BD, Wingfield MJ, Steenkamp ET. 2011. Causes and consequences of variability in peptide mating pheromones of ascomycete fungi. *Mol Biol Evol.* 28(7):1987-2003.
- Matute DR, McEwen JG, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT, Restrepo, A, Morais F, Nino-Vega G, Taylor JW. 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol.* 23: 65-73.
- Matute DR, Quesada-Ocampo LM, Rauscher JT, McEwen JG. 2008. Evidence for positive selection in putative virulence factors within the *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. *PLoS Negl Trop Dis.* 2(9): e296.

- McDonough ES, Lewis AL. 1967. *Blastomyces dermatitidis*: production of the sexual stage. *Science*. 28;156(774):528-529
- McInturff JE, Modlin RL, Kim J. 2005. The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *J Invest Dermatol.*;125:1-8.
- Meece JK, Anderson JL, Klein BS, Sullivan TD, Foley SL, Baumgardner DJ, Brummitt CF, Reed KD. 2010. Genetic diversity in *Blastomyces dermatitidis*: implications for PCR detection in clinical and environmental samples. *Med Mycol*. 48(2):285-90.
- Mendes-Giannini MJ, Monteiro da Silva JL, de Fátima da Silva J, Donofrio FC, Miranda ET, Andreotti PF, et al. 2008. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. *Mycopathologia.*;165:237-248.
- Molinari-Madlum EE, Felipe MS, Soares CM. 1999. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Med Mycol*. 37(4):269-76.
- Montoya AE, Alvarez AL, Moreno MN, Restrepo A, McEwen JG. 1999. Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 37: 219-22.
- Montoya AE, Moreno MN, Restrepo A, McEwen JG. 1997. Electrophoretic karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol*. 21(2):223-227.
- Morais FV, Barros TF, Fukada MK, Cisalpino PS, Puccia R. 2000. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol*. 38:3960–3966.
- Nascimento T, Martinez R, Lopes AR, Bernardes LAD, Barco CP, Goldman MHS, Taylor JW, McEwen JG, Nobrega MP, Nobrega FG, Goldman GH. 2004. Detection and selection of microsatellites in the genome of *Paracoccidioides brasiliensis* as molecular markers for clinical and epidemiological studies. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 5007-5014.
- Nemecek JC, Wuthrich M, Klein BS. 2006. Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science* 312:583–588.

- Nguyen VQ, Sil A. 2008. Temperature-induced switch to the pathogenic yeast form of *Histoplasma capsulatum* requires Ryp1, a conserved transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25;105(12):4880-4885
- Nino-Vega GA, Calcagno AM, San-Blas G, San-Blas F, Gooday GW, Gow NA. 2000. RFLP analysis reveals marked geographical isolation between strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* 38:437–441.
- Nylander JAA. 2002. MrModeltest Department of Systematic Biology, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- O’Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS. 2009. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 22;457(7228):471-474.
- Paes HC, Mello-de-Sousa TM, Fernandes L, Teixeira MM, Derengowski Lda S, Torres FA, Felipe MS. 2011. Characterisation of the heat shock factor of the human thermomorphogenic pathogen *Paracoccidioides lutzii*. *Fungal Genet Biol.* 48(10):947-955.
- Pagliari C, Pereira NV, Kanashiro L, Stegun FW, Croda J, Duarte MI, et al. 2010. Characterization of cytotoxic immune response in skin and mucosal lesions of paracoccidioidomycosis. *J Cutan Pathol.* 37:565-70.
- Paniago AMM, Aguiar JIA, Aguiar ES, Cunha RV, Pereira GR, Londero AT, Wanke B. 2003. Paracoccidioidomycosis - A clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 36(4):455-9.
- Paoletti M, Rydholm C, Schwieger EU, Anderson MJ, Szakacs G, Lutzoni F, JP Debeaupuis, Latgé JP, Denning DW, Dyer PS. 2005. Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Biol.* 15:1242-1248.
- Parra G, Blanco E, Guigo R. 2000. GenelD in *Drosophila*. *Genome Res* 10: 511-515.
- Peterson SW, Sigler L. 1998. Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. *J Clin Micro* 36:2918–2925.

- Poggeler, S. 2002. Genomic evidence for mating abilities in the asexual pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Genet.* 42:153–160.
- Powers S, Michaelis S, Broek D, Santa Anna S, Field J, Herskowitz I, Wigler M. 1986. RAM, a gene of yeast required for a functional modification of RAS proteins and for production of mating pheromone a-factor. *Cell* 47(3):413-422.
- Qi M, Elion EA. 2005. Formin-induced actin cables are required for polarized recruitment of the Ste5 scaffold and high level activation of MAPK Fus3. *J. Cell Sci*; 118:2837-48.
- Quegliato Jr. R, Grangeia TAG, Massucio RAC, De Capitani EM; Rezende SM, Balthazar AB. 2007. Associação entre Paracoccidioidomicose e tuberculose: realidade e erro diagnóstico. *J. bras. Pneumol.* 33(3):295-300
- Rannala B, Yang Z. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *J. Mol. Evol.* 43:304–311.
- Rappleye CA, Goldman WE. 2006. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu Rev Microbiol* 60:281–303.
- Reed SI. 1991. Pheromone signaling pathways in yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1(3):391-396.
- Rippon JW. 1988. Histoplasmosis (*Histoplasmosis capsulati*). In: Rippon JW (ed) *Medical Mycology*, 3rd edition, WB Saunders Company, Philadelphia, p. 381-423,
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574.
- Rydholm C, Szakacs G, Lutzoni F. 2006. Low genetic variation and no detectable population structure in *Aspergillus fumigatus* compared to closely related *Neosartorya* species. *Eukaryot. Cell* 5:650-657.

- Salamov AA, Solovyev VV. 2000. *Ab initio* gene finding in *Drosophila* genomic DNA. *Genome Res* 10: 516-522.
- Salgado-Salazar C, Jones LR, Restrepo, A McEwen JG. 2010. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. *Cladistics*. 26(6):613–624,
- San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. 2002 .*Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol*. 40(3):225-242.
- Sawyer SL, Malik HS. 2006, Positive selection of yeast nonhomologous end-joining genes and a retrotransposon conflict hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 21;103(47):17614-17619.
- Schrick K, Garvik B, Hartwell LH. 1997. Mating in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of the pheromone signal transduction pathway in the chemotropic response to pheromone. *Genetics* 147(1):19-32.
- Sengupta P, Cochran BH. 1991. MAT α 1 can mediate gene activation by a-mating factor. *Genes and Dev*. 5:1924-1934.
- Sharpton TJ, Stajich JE, Rounsley SD, Gardner MJ, Wortman JR, et al. 2009. Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives. *Genome Res* 19: 1722-1731.
- Shiu PK, Glass NL. 2000. Cell and nuclear recognition mechanisms mediated by mating type in filamentous ascomycetes. *Curr. Opin. Microbiol* 3:183-188.
- Sigler L. 1996. *Ajellomyces crescens* sp. nov., taxonomy of *Emmonsia* spp., and relatedness with *Blastomyces dermatitidis* (teleomorph *Ajellomyces dermatitidis*). *J. Med. Vet. Mycol*. 34:303-314.

- Silva MG, Schrank A, Bailão EF, Bailão AM, Borges CL, Staats CC, Parente JA, Pereira M, Salem-Izacc SM, Mendes-Giannini MJ, et al., 2011. The homeostasis of iron, copper, and zinc in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* var. *Grubii*, and *Cryptococcus gattii*: a comparative analysis. *Front Microbiol* 2:49
- Soares CM, Madlun EE, da Silva SP, Pereira M, Felipe MS. 1995. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol.* 33(2): 505-7
- Speed B, Dunt D, 1995. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Infectious Diseases.* 21: 28-34.
- Splendore A. 1912. Zymonematosi com localizzazione nella cavità della boca osservata in Brasile. *Bull Soc Path Exot* 1912;5:313-9.
- Stanke M, Steinkamp R, Waack S, Morgenstern B. 2004. AUGUSTUS: a web server for gene finding in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 32: W309-312.
- Sugiyama J. 1987. Pleomorphic fungi: the diversity and its taxonomic implications. Elsevier, Amsterdam.
- Swofford DL. 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Mol Biol** Evol. 28: 2731-2739.
- Taylor JW, Berbee ML. 2006. Dating divergences in the fungal tree of life: review and new analyses. *Mycologia* 98, 838–849.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Gêiser DM, Hibbett DS, Fisher MC. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol* 31:21–32.

- Taylor JW, Turner E, Pringle A, Dettman J, Johannesson H. 2007. Fungal species: thoughts on their recognition, maintenance and selection. Pp. 313-339, In 'Fungi in the Environment'. (British Mycological Society Symposia No. 25) eds.G.M. Gadd, SC. Watkinson PS Dyer. Cambridge: Cambridge University Press.
- Taylor JW. 1995. Molecular phylogenetic classification of fungi. Arch. Med. Research 26:307-314.
- Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, et al. 2009. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. Mol Phylogenet Evol 52: 273-283.
- Theodoro RC, Teixeira MM, Paduan KS; Ribolla PM, Felipe MSS, San-Blas G, Bagagli E. *Paracoccidioides* Genus: Species Recognition and Biogeographic Aspects. PloS ONE *in revision*
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Ac. Res. 22, 4673- 4680.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Ac. Res. 22, 4673- 4680.
- Torres I, García AM, Hernández O, González A, McEwen JG, Restrepo A, Arango M, 2010. Presence and expression of the Mating type locus in *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Fungal Genet Biol.* 47(4):373-80
- Untereiner WA, Scott JA, Naveau,FA, Sigler L, Bachewich J,Angus A. 2004. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. Mycologia 96: 812-821.
- Vicentini AP, Gesztesí JL, Franco MF, de Souza W, de Moraes JZ, Travassos LR, et al. 1994. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. Infect Immun.;62:1465-9.

- Vilela R, Rosa PS, Belone AF, Taylor JW, Diório SM, Mendoza L. 2009. Molecular phylogeny of animal pathogen *Lacazia loboi* inferred from rDNA and DNA coding sequences. *Mycol Res.* 113(8):851-7.
- Wang H, Xu Z, Gao L, Hao B. 2009. A fungal phylogeny based on 82 complete genomes using the composition vector method. *BMC Evol Biol.* 10;9:195
- Webster RH, Sil A. 2008. Conserved factors Ryp2 and Ryp3 control cell morphology and infectious spore formation in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 23;105(38):14573-14578.
- Wong SHJ, Dumas B. 2010. Ste12 and Ste12-like proteins, fungal transcription factors regulating development and pathogenicity. *Eukaryot. Cell* 9(4):480-485.

Artigos publicados e em fase de publicação como 1º autor e em colaboração relacionados a esta tese

Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, et al. 2009. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol* 52: 273-283.

Teixeira MM, Theodoro RC Oliveira F, Hahn RC, Bagagli E, San-Blas, G, Felipe MSS. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. *Med Mycol.* 2013 Jun 14.

Teixeira MM, Theodoro RC, Derengowsky LS, do Amaral Jr WR, Fernandes L, Bagagli EB, Felipe MSS. Genomic analysis and *in vitro* mating crossings reveals sexual abilities in the *Paracoccidioides* genus. *Eukaryot Cell.* 2013 Mar;12(3):380-9

Desjardins CA, Champion MD, Holder JW, Muszewska A, Goldberg J, Bailão AM, Brigido MM, Ferreira ME, Garcia AM, Grynberg M, Gujja S, Heiman DI, Henn MR, Kodira CD, León-Narváez H, Longo LV, Ma LJ, Malavazi I, Matsuo AL, Morais FV, Pereira M, Rodríguez-Brito S, Sakthikumar S, Salem-Izacc SM, Sykes SM, Teixeira MM, Vallejo MC, Walter ME, Yandava C, Young S, Zeng Q, Zucker J, Felipe MS, Goldman GH, Haas BJ, McEwen JG, Nino-Vega G, Puccia R, San-Blas G, Soares CM, Birren BW, Cuomo CA. 2011. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. *PLoS Genet.* 2011 Oct;7(10):e1002345

Theodoro RC, Teixeira MM, Paduan KS, Ribolla PM, Felipe MSS, San-Blas G, Bagagli E. *Paracoccidioides* Genus: Species Recognition and Biogeographic Aspects. *PLoS ONE* 7(5): e37694.

Anexo 2: Artigos publicados e em fase de publicação relacionados à linha de biologia molecular de fungos patogênicos humanos em co-autoria durante o período de doutorado

Abadio AK, Kioshima ES, Teixeira MM, Martins NF, Maigret B, Felipe MS. 2011.

Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens. *BMC Genomics*. 27;12:75.

Paes HC, Mello-de-Sousa TM, Fernandes L, Teixeira MM, Derengowski Lda S, Torres FA,

Felipe MS. 2011.Characterisation of the heat shock factor of the human thermomorphogenic pathogen *Paracoccidioides lutzii*. *Fungal Genet Biol*. 48(10):947-955.

Morais OO, Porto C, Coutinho AS, Reis CM, Teixeira MM, Gomes CM. 2011. Infection of the

lymphatic system by *Aureobasidium pullulans* in a patient with erythema nodosum leprosum. *Braz J Infect Dis*.15(3):288-292.

Lozano VF, Lins TC, Teixeira MM, Vieira RG, Blotta MH, Goes AM, Silva IC, Pereira RW,

Bocca AL, Felipe MS. Polymorphism analysis of the CTLA-4 gene in paracoccidioidomycosis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Mar;106(2):220-6.

Anexo 1: Proteínas relacionados a maquinaria de ciclo sexual, identificados por buscas nos genomas dos fungos dimórficos (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dimorphic_fungi/MultiHome.html) usando BLAST. A tabela contém o nome da proteína, função atribuída em *S. cerevisiae* e o número de acesso de todos organismos analisados.

gene	Função	<i>P. brasiliensis</i>	<i>P. lutzii</i>	<i>H. capsulatum</i>	<i>B. dermatitidis</i>	<i>C. immitis</i>	<i>C. posadasii</i>
Receptores de feromônios							
<i>ste2</i>	Receptor de feromônio - fator α	PABG_05794.1 PADG_06133.1	PAAG_05858.1	HCEG_07018.2 HCDG_07520.2 HCBG_05246.2 HCAG_01152.1	BDBG_06628.1 BDCG_05989.1	CIRG_00093.1 CISG_05223.1 CIMG_00128.3 CIHG_06153.1	CPAG_02783.1 CPSG_02238.1
<i>ste3</i>	Receptor de feromônio - fator α	PADG_05797.1 PABG_05483.1	PAAG_07295.1	HCEG_04107.2 HCBG_02061.2 HCDG_09288.2 HCAG_02974.1	BDCG_09273.1 BDBG_08467.1	CIRG_02936.1 CISG_09735.1 CIMG_06159.3 CIHG_02609.1	CPAG_03513.1 CPSG_00365.1
Componentes envolvidas no processo transdução de sinal da reprodução sexuada							
<i>gba1</i>	Subunidade alfa ligante de GTP da proteína heterotrimérica G que é ligada aos receptores de feromônios;	PADG_07281.1 PABG_03841.1	PAAG_08675.1	HCEG_06511.2 HCDG_05262.2 HCAG_00742.1	BDBG_00930.1 BDCG_03938.1	CIRG_03671.1 CISG_00878.1 CIMG_06818.3 CIHG_03918.1	CPAG_04191.1 CPSG_01054.1

<i>ste4</i>	Subunidade beta da proteína G ligada aos recetores de feromônios. É capaz de formar um dímero com Ste18p ativando a cascata de mating,	PADG_05621.1 PABG_04961.1	PAAG_02472.1	HCBG_01695.2 HCEG_03739.2 HCDG_06834.2 HCAG_02608.1	BDBG_07809.1 BDCG_05179.1	CIRG_08531.1 CISG_01888.1 CIMG_09237.3 CIHG_00905.1	CPAG_08170.1 CPSG_08398.1
<i>ste18</i>	Subunidade gama da proteína heterotrimérica G que é ligada aos receptores de feromônios. Forma um dímero com Ste4p para ativar a cascata de sinalização de mating.	PADG_04014.1 PABG_01415.1	PAAG_00817.1	HCBG_00723.2 HCDG_03210.2 HCAG_03570.1 HCEG_05463.2	BDBG_09031.1 BDCG_01469.1	CIRG_04721.1 CISG_01325.1 CIMG_11421.3 CIHG_08827.1	CPAG_06688.1 CPSG_08760.1
<i>ste20</i>	Proteína relacionada a família da cinases transdutora de sinal de PAK (cinase p21 ativada). Está envolvida com a via de resposta ao feromônio/crescimento filamentoso. É ativada por Cdc42p; Se liga a Ste4 pelo motivo GBB presente no domínio não catalítico das PAK cinases	PABG_07870.1 PADG_08706.1	PAAG_09053.1	HCBG_03086.2 HCEG_08460.2 HCAG_11669.1	BDCG_07827.1 BDBG_04332.1	CISG_04592.1 CIRG_01312.1 CIMG_01236.3 CIHG_01462.1	CPAG_01622.1 CPSG_03046.1

<i>ste11</i>	<p>Serina/Treonina cinase requerida para transdução de sinal um tipo celular específico</p> <p>MEK cinase envolvida na via de resposta a feromônio/crescimento filamentosos onde fosforila Ste7p ha uma alta osmolaridade; É regulada por Ste20p e Ste50p</p>	PADG_02230.1 PABG_06721.1	PAAG_00450.1	HCEG_08107.2 HCAG_09047.1 HCBG_05450.2	BDBG_03667.1 BDCG_02225.1	CIRG_02775.1 CIMG_06015.3 CIHG_08509.1 CISG_05550.1	CPAG_03354.1 CPSG_01262.1
<i>ste7</i>	<p>Proteína transdutoras de sinal MAR cinase cinase envolvida na via de resposta a feromônio onde fosforila Fus3p ou crescimento filamentosos fosforilando KSS1p</p>	PADG_05980.1 PABG_05652.1	PAAG_06020.1	HCAG_03461.1 HCEG_02116.2 HCBG_03159.2	BDBG_08946.1 BDCG_05401.1	CIHG_02390.1 CIRG_00556.1 CISG_05608.1 CIMG_00541.3	CPAG_02344.1 CPSG_01703.1
<i>fus3</i>	<p>Proteína Serina/Treonina cinase ativada por mitógeno envolvida na via de resposta a feromônio. É fosforilada por Ste7p; Seus substratos incluem: Ste12p, Far1p,</p>	PADG_04880.1 PABG_04490.1	PAAG_05033.1	HCBG_02698.2 HCEG_01838.2 HCAG_05250.1	BDBG_00306.1 BDCG_08377.1	CIRG_01852.1 CISG_01041.1 CIMG_01715.3 CIHG_05783.1	CPAG_01107.1 CPSG_03563.1

	Bni1p, Sst2p						
<i>ste12</i>	Fator de transcrição envolvida na ativação dos genes de mating	PABG_06687.1 PADG_02268.1	PAAG_00406.1	HCBG_05411.2 HCDG_08265.2 HCAG_08552.1	BDBG_03851.1 BDCG_02041.1	CISG_05588.1 CIMG_06050.3 CIHG_02477.1 CIRG_02811.1	CPAG_03391.1 CPSG_01223.1
Enzimas processadoras de feromônios envolvidas no processo de reprodução sexuada							
<i>ram1</i>	Subunidade Beta da Farnesiltransferase CAAX (FTase) que prenila o fator a do feromônio sexual e proteínas; Requisitada para colocolização de proteínas Ras e do fator a na membrana.	PADG_01610.1 PABG_03083.1	PAAG_07086.1	HCDG_00948.2 HCBG_04106.2 HCEG_00673.2 HCAG_06093.1	BDBG_02303.1 BDCG_03260.1	CIHG_02421.1 CIRG_00582.1 CIMG_10576.3 CISG_09249.1	CPAG_02321.1 CPSG_01679.1
<i>ram2</i>	Subunidade alfa de ambas farnesiltransferase e tipo I de geranilgeraniltransferase que cataliza a prenilação de proteínas que contém o domínio CAAX; Requisitada para colocolização de proteínas Ras e	PADG_04113.1 PABG_01506.1	PAAG_00717.1	HCDG_00316.2 HCEG_04796.2 HCBG_00121.2 HCAG_04241.1	BDBG_01859.1 BDCG_03704.1	CIRG_10365.1 CISG_04923.1 CIMG_05727.3 CIHG_10271.1	CPAG_08538.1 CPSG_08023.1

	do fator a na membrana.						
rce1p	Protease CAAX prenil do tipo II envolvida na proteólise e maturação do fator a do feromônio sexual	PABG_06930.1 PADG_06229.1	PAAG_03593.1	HCBG_08646.2 HCEG_07570.2 HCAG_06839.1 HCDG_05819.2	BDBG_07699.1 BDCG_05297.1	CIRG_10002.1 CIMG_02653.3 CISG_07169.1	CPAG_00205.1 CPSG_04392.1
ste24	Metaloprotease de zinco altamente conservada envolvida em dois passos na maturação do fator a do feromônio sexual: Proteólise da porção CAAX e atua como primeiro passo para o processamento proteolítico da porção N-terminal	PABG_01483.1 PADG_04087.1	PAAG_00744.1	HCEG_04836.2 HCDG_00275.2 HCBG_00087.2 HCAG_04210.1	BDBG_01827.1 BDCG_03734.1	CIRG_08875.1 CIMG_09552.3 CIHG_03524.1 CISG_04862.1	CPAG_08482.1 CPSG_08078.1
ste14	Farnesil cisteína-carboxil metiltransferase que media o passo de metilação do grupamento carboxil, durante o processamento do motivo CAAX do feromônio fator a e proteínas do tipo Ras no retículo	PADG_05218.1 PABG_07253.1	PAAG_07523.1	HCEG_01161.2 HCDG_01437.2 HCBG_04580.2	BDCG_00167.1 BDBG_08109.1	CIRG_00890.1 CISG_04991.1 CIMG_00855.3 CIHG_03197.1	CPAG_02017.1 CPSG_02634.1

	endoplasmático.						
ste6	Transportador tipo ABC ligante de ATP e localizado na membrana utilizado na exportação do feromônio fator a ; Cataliza a hidrólise de ATP do fator a .	PADG_05835.1 PABG_05520.1	PAAG_07335.1	HCBG_02103.2 HCEG_04344.2 HCAG_10172.1 HCDG_09333.2	BDBG_08511.1 BDCG_09226.1	CIRG_02986.1 CIMG_06197.3 CIHG_02661.1 CISG_08387.1	CPAG_03558.1 CPSG_00409.1
kex1	Protease envolvida no processamento do fator α ; cleava resíduo de lisina e arginina na porção C-terminal de peptídeos e preteínas	PADG_02348.1 PABG_06619.1	PAAG_00330.1	HCEG_07986.2 HCAG_01993.1 HCDG_08343.2 HCBG_05330.2	BDBG_03944.1 BDCG_01958.1	CIRG_04052.1 CIMG_07181.3 CIHG_08964.1	CPAG_04553.1 CPSG_00052.1
kex2	Endoprotease de processamento do fator α	PADG_01553.1 PABG_03025.1	PAAG_07022.1	HCBG_04168.2 HCAG_07015.1 HCEG_00740.2 HCDG_01009.2	BDCG_03334.1 BDBG_02235.1	CIRG_00656.1 CIMG_00625.3 CIHG_07322.1 CISG_05450.1	CPAG_02247.1 CPSG_02405.1
ste13	Dipeptidil aminopeptidase, localizada na membrana do complexo de Golgi que cleava o sítio repetitivo de	PABG_03771.1 PADG_00053.1	PAAG_01724.1	HCBG_06672.2 HCEG_00116.2 HCDG_08512.2	BDBG_00095.1 BDCG_08583.1	CIMG_02340.3 CIRG_09138.1 CIHG_07233.1	CPSG_04071.1 CPAG_00519.1

	proteínas X-ala- sequences, requisitada no processo de maturação do fator α . Transcrição induzida pelo fator a			HCAG 06318.1		CISG 07856.1	
--	---	--	--	------------------------------	--	------------------------------	--