



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

“Análise da expressão gênica de potenciais fatores de virulência do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* submetido a diferentes condições experimentais”

Lorena da Silveira Derengowski

Orientadora: Prof. Dra. Ildinete Silva Pereira

Brasília, 2006



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

“Análise da expressão gênica de potenciais fatores de virulência do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* submetido a diferentes condições experimentais”

Lorena da Silveira Derengowski

Orientadora: Prof. Dra. Ildinete Silva Pereira

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

Brasília, 2006

Trabalho desenvolvido no Laboratório de
Biologia Molecular, da Universidade de
Brasília, sob orientação da Prof. Dra. Ildinete
Silva Pereira.

Banca Examinadora:

Dra. Anamelia Lorenzetti Bocca
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília (UnB)

Dra Ildinete Silva Pereira
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília (UnB)

Dra. Silvana Petrofeza Silva
Departamento
Universidade

Suplente:

Dra Cynthia Maria Kyaw
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília (UnB)

*“A vida inteligente em um planeta torna-se amadurecida quando pela primeira vez
compreende a razão da sua própria existência.”*

Richard Dawkins

Aos dias chuvosos, que me exigiram paciência...

Aos dias nublados, que me trouxeram a esperança...

Aos dias ensolarados, que me deram a recompensa...

Dedico esse trabalho aos meus queridos pais, Ana Heloísa e Vitor, com a certeza de que sem eles os dias chuvosos seriam muito mais longos, os nublados muito mais difíceis, e a recompensa não seria tão bela! Obrigada pelo amor e a amizade de sempre!

Agradecimentos

Aos **meus pais**, Ana Heloísa e Vitor, e à **minha irmã**, Nathalia, pela presença constante! Agradeço por tudo que vocês fizeram nessa minha longa jornada de estudante! E, principalmente, por terem me dado esse lindo presente que é a família! Amo muito vocês...sempre!

À minha queridíssima orientadora, **Ildinete**, por toda confiança depositada, por não me deixar abater com as dificuldades e por tirar ensinamentos até dos resultados negativos! Prof, só tenho a te agradecer! Você é uma grande orientadora e, mais do que isso, uma grande amiga!

Ao **Felipe** (Godinho), pelo companheirismo de todas as horas, pelo amor e amizade que me fortaleceram e me fizeram mais corajosa, e, principalmente, pela compreensão nos momentos de TPD (tensão pré-defesa). Obrigada meu anjo!

Aos professores **Renato Resende** e **Loreny Giugliano**, por todos os ensinamentos e por me mostrarem o prazer inexplicável de pesquisar! Vocês serão, eternamente, queridos orientadores!

Aos professores **Cynthia**, **Márcio** e **Marcelo Brígido**, por sempre estarem dispostos a me ajudar, e por todas as cervejas que tomamos juntos! Mais que ótimos professores, vocês se tornaram bons amigos!

Ao amigo e co-orientador **Aldo**, pelos conselhos, idéias, artigos, enfim, pela enorme ajuda nesse trabalho, e, não menos importante, pela grande amizade que se formou! Valeu!

Aos grandes amigos-irmãos do Lab 3, **Thiago**, **Luciano**, **Júnior** e **Sérgio**, por fazerem do trabalho uma diversão! Obrigada por todas as piadas, gargalhadas, cervejadas, e também pela ajuda de sempre nos experimentos! “A gente ganha pouco, mas se diverte!”.

Aos professores **Andréa, Lídia, Fernando, Sueli, Élide e Marco**, pelas pertinentes dicas e pelo agradável convívio! Às professoras **Anamelia, Silvana e Cynthia**, pelo aceite em compor minha banca. E aos **demais professores do IB**, em especial à professora **Cláudia Renata**, por fazerem parte da minha formação!

Aos verdadeiros amigos da graduação, **Nádia, Thiago, Paulo e Verônica**, pela força e companheirismo, seja nos momentos de estudo, seja nas noitadas, viagens e cachaçadas! Podem estar certos de que hoje vocês fazem parte da minha “seleta” lista de grandes amigos!

A **todos os amigos da BioMol** (que são tantos e, por isso, não me arriscarei a escrever o nome de todos)! Obrigada por todo o auxílio, pelas discussões, comentários e, em especial, por todas as risadas e pela agradável convivência!

Aos **amigos da Microbiologia**, em especial ao Alex, por sempre me acolherem com muito carinho!

Às funcionárias do laboratório, **Fátima e Dona Ivonildes**, e do departamento, **Ana e Sandra**, pela presteza e disposição em me ajudar quando preciso!

A todos os **meus familiares**, Vó Nair, Vô Marcellino, Vó Diva (*in memoriam*), tios (em especial o tio-irmão Fábio), tias e primos, que mesmo achando que biologia molecular é coisa de doido, sempre me apoiaram e demonstraram orgulho!

Aos meus grandes amigos, do passado, futuro e presente, **Barbara** (acompanhada do **Henrique**), **Tella, Rafa, Rê e Carol**, pelas ótimas conversas e farras que não me deixaram esquecer que a vida é muito mais do que material genético!

“Acima de tudo, na vida, temos necessidade de alguém que nos obrigue a realizar aquilo de que somos capazes. É este o papel da amizade”.

(autor desconhecido)

Índice

Lista de Abreviaturas	xiii
Resumo	xv
Abstract	xvi
Introdução	1
1. O <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e a Paracoccidioidomicose	1
2. Virulência	7
2.1. Parede Celular	10
2.2. Metabolismo – Ciclo do Glioxalato	11
2.3. Detoxificação	15
2.4. Outros determinantes de virulência	17
Objetivos e Estratégias Experimentais	20
Material	22
1. Meios de cultura – <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	22
2. Antibióticos	24
3. Solução corante Verde-Janus	25
4. Soluções utilizadas para dosagem dos níveis de açúcar redutor	25
5. Solução de lavagem das células	26
6. Soluções utilizadas para extração de DNA genômico	26
7. Soluções livres de RNase	27
8. Enzimas utilizadas	27
9. Tampões de enzimas	27
10. Soluções para eletroforese em géis de agarose	28
11. Marcadores de massa molecular (MM)	28

Metodologia	29
1. Manutenção e cultivo do fungo <i>P. brasiliensis</i>	
1.1. Condição de manutenção e cultivo do fungo para obtenção de DNA genômico e RNA total visando à padronização dos experimentos	29
1.2. Condição de pré-cultivo para obtenção de RNA total para análise dos níveis de expressão dos potenciais fatores de virulência	29
2. Dosagem dos níveis de açúcar redutor	30
3. Cultivo <i>in vitro</i> do fungo em condições que potencialmente mimetizam o interior do fagossomo	31
3.1. Cultivo de <i>P. brasiliensis</i> em condição de estresse nutricional	31
3.2. Cultivo de <i>P. brasiliensis</i> em pH exógeno ácido	31
4. Detecção da atividade da enzima urease de <i>P. brasiliensis</i>	32
5. Desenho dos oligonucleotídeos visando à amplificação dos genes de interesse	32
6. Extração do DNA genômico de <i>P. brasiliensis</i>	33
7. Padronização das condições de amplificação	34
8. Análise de ácidos nucléicos por eletroforese em gel de agarose	35
9. Estabelecimento da fase exponencial de amplificação	35
10. Extração de RNA total de <i>P. brasiliensis</i>	36
11. Tratamento do RNA total com DNase I livre de RNAses	36
12. RT-PCR semiquantitativa	37
12.1. Síntese da primeira fita de cDNA	37
12.2. PCR	37
13. Análise da expressão de potenciais genes de virulência do fungo <i>P. brasiliensis</i> recuperado de macrófagos peritoniais de camundongos	38
14. Quantificação dos níveis de expressão gênica utilizando-se o programa “Scion Image”	39
15. Análise estatística dos resultados	39

Resultados e Discussão	40
1. Estabelecimento da condição de pré-cultivo do fungo <i>P. brasiliensis</i>	40
2. Padronização das condições de amplificação dos genes a serem estudados	41
3. Estabelecimento da fase exponencial de amplificação	43
4. Análise comparativa dos níveis de expressão dos genes <i>icl1</i> , <i>icl2</i> , <i>mls1</i> e <i>ady2</i> de <i>P. brasiliensis</i> cultivado, <i>in vitro</i> , em diferentes condições nutricionais	45
5. Detecção da atividade da enzima urease de <i>P. brasiliensis</i>	55
6. Análise comparativa dos níveis de expressão do gene <i>ure1</i> de <i>P. brasiliensis</i> cultivado, <i>in vitro</i> , em diferentes pHs	57
7. Análise da expressão de genes relacionados ao ciclo do glioxalato do fungo <i>P. brasiliensis</i> recuperado de macrófagos peritoniais de camundongos	60
Principais Resultados	67
Perspectivas	69
Referências Bibliográficas	70

Índice de Figuras e Tabelas

Figuras

Figura 1. Principais categorias estabelecidas para os transcritos identificados pelo Projeto Genoma Funcional e Diferencial de <i>P. brasiliensis</i> .	8
Figura 2. O ciclo do glioxalato e sua relação com o ciclo do ácido cítrico.	12
Figura 3. Curva de crescimento da forma de levedura do isolado <i>Pb01</i> de <i>P. brasiliensis</i> e monitoramento do consumo de glicose pelo fungo.	40
Figura 4. Padronização das condições de amplificação dos genes em estudo.	41
Figura 5. Determinação da faixa exponencial de amplificação para os potenciais genes de virulência de <i>P. brasiliensis</i> a serem estudados.	43
Figura 6. Análise da viabilidade de células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> após cultivo por 5 horas em meio contendo acetato como única fonte de carbono.	45
Figura 7. Perfil eletroforético do RNA total extraído do fungo <i>P. brasiliensis</i> cultivado em meio MVM-glicose ou meio MVM-acetato.	46
Figura 8. Perfil eletroforético do RNA total do fungo <i>P. brasiliensis</i> após tratamento com DNase I livre de RNases.	47
Figura 9. Análise comparativa da expressão dos genes <i>icl1</i> , <i>icl2</i> , <i>mls1</i> e <i>ady2</i> de <i>P. brasiliensis</i> quando do cultivo do fungo por diferentes intervalos de tempo em meio contendo 2 % de glicose ou 2 % de acetato de sódio como única fonte de carbono.	48
Figura 10. Análise semiquantitativa dos níveis de expressão dos genes <i>icl1</i> e <i>icl2</i> de <i>P. brasiliensis</i> feita utilizando-se ferramentas do programa “Scion Image”.	49
Figura 11. Análise semiquantitativa dos níveis de expressão dos genes <i>mls1</i> e <i>ady2</i> de <i>P. brasiliensis</i> feita utilizando-se ferramentas do programa “Scion Image”.	50
Figura 12. Teste de atividade da enzima urease de <i>P. brasiliensis</i> .	55
Figura 13. Análise comparativa da expressão do gene <i>ure1</i> de <i>P. brasiliensis</i> quando do cultivo do fungo em pH neutro ou em pH ácido por diferentes intervalos de tempo, pela metodologia de RT-PCR semiquantitativa.	58

Figura 14. Análise semiquantitativa dos níveis de expressão do gene <i>ure1</i> feita utilizando-se ferramentas do programa “Scion Image”.	58
Figura 15. Análise comparativa da expressão dos genes <i>icl1</i> (A) e <i>mls1</i> (B) de <i>P. brasiliensis</i> quando do co-cultivo do fungo com macrófagos peritoniais de camundongo por 6 h, por meio de RT-PCR semiquantitativa.	60
Figura 16. Análise semiquantitativa dos níveis de expressão dos genes <i>icl1</i> e <i>mls1</i> do fungo <i>P. brasiliensis</i> feita utilizando-se ferramentas do programa “Scion Image”.	61
Figura 17. Análise comparativa da expressão do gene <i>ady2</i> de <i>P. brasiliensis</i> quando do cultivo do fungo em co-cultura com macrófagos peritoniais de camundongo por 6 h, empregando-se a metodologia de RT-PCR semiquantitativa.	63
Figura 18. Análise semiquantitativa dos níveis de expressão do provável gene <i>ady2</i> do fungo <i>P. brasileinsis</i> feita utilizando-se ferramentas do programa “Scion Image”.	64

Tabelas

Tabela 1. Genes de virulência descritos em <i>C. albicans</i> e/ou <i>H. capsulatum</i> e identificados no Transcriptoma de <i>P. brasiliensis</i> .	9
Tabela 2. Ensaio realizado em diferentes concentrações de glicose para a construção da curva de calibração a ser utilizada nos experimentos para determinação da quantidade de açúcar redutor presente no meio.	29
Tabela 3. Dados gerais dos oligonucleotídeos sintetizados.	32
Tabela 4. Determinação do pH do meio exógeno após cultivo do fungo <i>P. brasiliensis</i> por diferentes períodos de tempo (0,5 h; 1 h; 5 h; 18 h) em pH neutro (7.0) ou em pH ácido (4.5).	57

Lista de abreviaturas

BSA	Albumina bovina sérica
°C	Graus Celsius
cDNA	Seqüência de DNA complementar
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAse	Desoxirribonuclease
DNS	Ácido Dinitrosalicílico
dNTP	Desoxinucleotídeos 5'-trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
g	Grama
g	Força gravitacional
h	Hora
L	Litro
log	logarítmico
M	Molar
mA	Miliamperes
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Massa molecular
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MVM	Meio de cultura Mac Veigh-Morton
ng	Nanograma
OD ₅₄₀	Densidade ótica a 540 nm
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato de sódio

PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	picomoles
p/v	peso/volume
RNA	Ácido ribonucléico
RNAse	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcrição Reversa
RT-PCR	Transcrição Reversa - Reação em cadeia da polimerase
SDS	Sódio dodecil sulfato
TA	Temperatura ambiente
TE	Tampão Tris-EDTA
TEB	Tampão Tris-EDTA-borato
Tris	Tri(hidroximetil)aminometano
U	Unidade enzimática
UV	Raio ultravioleta
v	Volume
V	Volts
YPD	Meio de cultura Yeast-Peptone-Dextrose
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
%	Por Cento

Resumo

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose, a micose sistêmica de maior prevalência na América Latina. O mecanismo mais importante de defesa do hospedeiro contra infecções por *P. brasiliensis* é a resposta imunológica celular. Esse fungo é capaz de sobreviver e se replicar no interior de macrófagos murinos e humanos, revelando a existência de mecanismos que permitam a sobrevivência no ambiente inóspito do fagossomo da célula hospedeira. Em concordância com essa habilidade de *P. brasiliensis* em sobreviver nesse ambiente de carência nutricional, estresse oxidativo e baixo pH, análises do transcriptoma desse fungo revelam ortólogos a potenciais genes de virulência de outros microrganismos patogênicos. Nesse contexto, esse trabalho descreve a análise da expressão de potenciais genes de virulência de *P. brasiliensis* por RT-PCR. Visando a avaliar a expressão dos genes *icl1* (isocitrato liase) e *mls1* (malato sintase), que codificam as enzimas do ciclo do glioxalato, leveduras de *P. brasiliensis* foram crescidas em condições que potencialmente mimetizam às encontradas no interior do fagossomo, substituindo-se glicose por acetato como única fonte de carbono. Os resultados sugerem um significativo aumento na expressão de *icl1* e *mls1* quando do cultivo do fungo em meio contendo apenas acetato. A mesma análise foi feita para os genes *ady2*, que codifica uma permease de acetato, e *icl2*, que parece codificar outra isoforma da enzima isocitrato liase. Entretanto, os resultados indicam que os genes *ady2* e *icl2* de *P. brasiliensis* são regulados independentemente das fontes de carbono utilizadas nesse trabalho. Ainda, a expressão de *ure1* (urease) foi analisada quando do cultivo de *P. brasiliensis* em pH ácido. Esses experimentos não mostraram uma regulação do gene *ure1* desse fungo dependente de pH. Adicionalmente, esse trabalho descreve, pela primeira vez, experimentos de RT-PCR utilizando RNA extraído de leveduras de *P. brasiliensis* após 6 horas de co-cultura com macrófagos murinos. Os resultados mostram um aumento no nível de expressão dos genes *icl1*, *mls1* e *ady2*, quando comparada à expressão por células crescidas em meio convencional. Essas observações indicam claramente que *P. brasiliensis* utiliza o ciclo do glioxalato como uma importante via metabólica alternativa para produção de energia, como observado para outros fungos.

Abstract

The fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the etiologic agent of paracoccidioidomycosis, the most prevalent systemic mycosis in Latin America. The most important mechanism of host defense against *P. brasiliensis* infection is cell-mediated immune response. This fungus is able to survive and replicate within the phagosome of murine and human macrophages, revealing that it has evolved mechanisms allowing its survival within the phagocytic cells, which are considered an inhospitable habitat. In agreement with the ability to survive in this nutritionally poor, oxidative stress and low pH environment, the analysis of *P. brasiliensis* transcriptome revealed several putative orthologs to virulence genes of other human facultative intracellular pathogenic microorganisms. In this context, this work describes the analysis of putative virulence genes expression by RT-PCR. In order to evaluate the expression of glyoxylate cycle genes, *icl1* (isocitrate lyase) and *mls1* (malate synthase), the yeast form of *P. brasiliensis* was grown in media mimicking the phagosome milieu, in which glucose was replaced by acetate as a sole carbon source. The results suggest a significantly increase in the *icl1* and *mls1* expression when this fungus was grown in media with acetate as the only carbon source. The same analysis was performed for *ady2* gene, that encodes an acetate permease, and *icl2* gene, that probably encodes another putative isoform of isocitrate lyase enzyme. However, the results indicate that *ady2* and *icl2* genes of *P. brasiliensis* are not regulated by these different carbon sources used in this work. On the other hand, the expression of *ure1* (urease) was analyzed in this work when *P. brasiliensis* yeast cells were grown in acid pH, mimicking the phagosome environment. These experiments don't show a pH-dependent regulation by *ure1* gene of this fungus. In addition, this work describes for the first time RT-PCR experiments using RNA extracted from yeast cells recovered from murine macrophages after 6 hours of co-culture. The results show the higher levels of *icl1*, *mls1* and *ady2* gene expression when compared to cells grown in conventional media. These observations clearly indicate that *P. brasiliensis* uses the glyoxylate cycle as an important alternative energetic metabolism pathway, as observed for other fungi.

Introdução

1. O *Paracoccidioides brasiliensis* e a Paracoccidioidomicose

O Reino Fungi é composto por mais de 70000 espécies de fungos identificadas até o presente momento (Raven *et al.*, 2001). Nas últimas décadas, a relevância clínica desse reino vem aumentando, principalmente em virtude das infecções oportunistas que acometem pacientes imunodeprimidos (revisito por Romani, 2004). Dentre os fungos de importância médica destacam-se os fungos dimórficos, responsáveis pela maioria das infecções sistêmicas de humanos e outros mamíferos. Os fungos dimórficos são representados por patógenos como *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Blastomices dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*. O mecanismo de transição dimórfica desses patógenos mostra-se fundamental para o estabelecimento da infecção, sendo desencadeado por uma série de fatores relacionados à interação patógeno – hospedeiro (San-Blas & San-Blas, 1994; Odds *et al.*, 2001; Gow *et al.*, 2002; revisito por Rooney & Klein, 2002).

Primeiramente relatado por Lutz em 1908 (revisito por San-Blas & Niño-Vega, 2001), o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é descrito como o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica prevalência na América Latina (Franco, 1987; McEwen *et al.*, 1995; Restrepo *et al.*, 2001). As áreas de maior incidência da PCM são: Brasil (80% dos casos), Venezuela e Colômbia (McEwen *et al.*, 1995; Restrepo *et al.*, 2001). Regiões em que a PCM é endêmica estendem-se do México à Argentina, apresentando temperaturas que variam entre 18 e 24°C, altos índice pluviométricos, e altitudes entre 1300 e 1700 m (revisito por San-Blas & Niño-Vega, 2001). É estimado que cerca de 10 milhões de pessoas possam ter sido infectadas, sendo que aproximadamente 2% desenvolvem formas sintomáticas da doença (Restrepo *et al.*, 2001). No Brasil ocorrem aproximadamente 200 mortes por ano em virtude da PCM, com os estados da região sul, sudeste e centro-oeste apresentando maiores incidências (Coutinho *et al.*, 2002).

Atualmente, comparações filogenéticas baseadas em seqüências de nucleotídeos do RNA ribossomal, associadas a análises morfológicas, vêm permitindo a classificação do fungo *P. brasiliensis* como um ascomiceto (filo Ascomycota), membro da ordem Onygenales, família Onygenaceae. Pertencentes ao mesmo clado estão algumas espécies de fungos dimórficos e patogênicos como *Blastomices dermatitidis*, *Emmonsia* e *H. capsulatum* (Peterson & Sigler, 1998).

A definição de espécie utilizando-se apenas o caráter fenotípico é bastante difícil, principalmente no reino Fungi. Desde 1930, quando foi descrito por Almeida (revisto por Franco *et al.*, 1994), o fungo *P. brasiliensis* vem sendo considerado como uma espécie única. Entretanto, é notável a diversidade genética entre diferentes isolados de *P. brasiliensis* (Molinari-Madlum, *et al.*, 1999; Matute *et al.*, 2006), além da grande variação nos níveis de virulência desses isolados em modelos de infecção experimental estabelecidos (Singer-Vermes *et al.*, 1989). Recentemente, Matute *et al.* (2006) propuseram, com base em estudos filogenéticos de 65 isolados de *P. brasiliensis*, a existência de três diferentes espécies crípticas decorrentes de dois eventos independentes de especiação, correlacionados ao padrão de distribuição dessas potenciais espécies.

O processo de transição dimórfica de *P. brasiliensis*, *in vitro*, é dependente da mudança de temperatura sugerindo que de alguma forma, o fungo percebe e responde, via sinalização celular, a esse sinal. À temperatura ambiente (25 °C), *P. brasiliensis* se apresenta na forma de micélio, diferenciando-se para a forma de levedura quando submetido à temperatura de 37°C (*in vitro*) ou a partir da invasão de tecidos do hospedeiro (San-Blas & San-Blas, 1982). Dessa forma, esse processo de transição dimórfica é facilmente reproduzido *in vitro* a partir da simples mudança da temperatura de incubação do microrganismo, o que faz de *P. brasiliensis* um excelente modelo para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos no dimorfismo (San-Blas, 1985).

O habitat e o ciclo biológico de *P. brasiliensis* ainda não foram determinados com precisão, sendo provável, com base nas informações acumuladas até o presente momento, que este apresente uma fase saprofítica no solo e/ou em vegetais (Restrepo *et al.*, 2001).

Presume-se que a forma miceliana do fungo, em seu ambiente natural, produza conídios, os quais mediarão sua disseminação. Após inalados, os conídios atingirão os pulmões, onde sofrerão a transição para a forma de levedura, fundamental para o estabelecimento da infecção (revisado por Rooney & Klein, 2002). Posteriormente, a infecção poderia ser disseminada para os demais tecidos do hospedeiro, tornar-se latente ou crônica, ou ainda ser erradicada, dependendo da resposta imunológica do hospedeiro e da virulência do fungo (Franco, 1987; San-Blas *et al.*, 2002).

Embora por muito tempo o homem tenha sido considerado o único hospedeiro de *P. brasiliensis*, recentemente foi relatado um caso de infecção de um cão adulto doméstico no qual foi verificado a formação de granuloma epitelióide, lesão característica da manifestação clínica da PCM (Ricci *et al.*, 2004). Além disso, alguns trabalhos vêm mostrando a infecção de tatus (*Dasyus novemcinctus*) capturados em áreas cuja incidência da PCM é endêmica. Inicialmente supunha-se que o tatu fosse um reservatório natural do fungo, uma vez que não havia evidências clínicas da doença no animal infectado (Bagagli *et al.*, 1998). Entretanto, a formação de granuloma em torno do fungo foi posteriormente observada em diversos órgãos do tatu, tais como pulmão, baço e fígado, sugerindo que esses animais sejam também um possível hospedeiro de *P. brasiliensis* (Restrepo *et al.*, 2001). O fato de a PCM atingir predominantemente trabalhadores rurais ou pessoas que diretamente lidam com a terra vem sendo associado, de maneira interessante, aos hábitos de vida e nicho ecológico do tatu (Brummer *et al.*, 1993; Restrepo *et al.*, 2001). Acredita-se que a contaminação de homens e tatus por *P. brasiliensis* possa ser ocasionada devido a atividades provavelmente relacionadas ao habitat do fungo (Wanke & Londero, 1994).

A PCM é predominantemente detectada em adultos do sexo masculino (80 a 90% dos casos), chegando a uma taxa homem:mulher de 78:1 casos (Restrepo *et al.*, 1984). Essa maior incidência em indivíduos do sexo masculino não apresenta relação com o grau de exposição dos mesmos, uma vez que estudos indicam que ambos os sexos apresentam contato similar com o patógeno. Além disso, indivíduos que ainda não atingiram a puberdade desenvolvem a doença independentemente do sexo. Essas observações vem sendo relacionadas a componentes hormonais do hospedeiro, os quais provavelmente

podem modular a patogenia do fungo (San-Blas & Niño-Vega, 2001; revisto por Borges-Walmsley *et al.*, 2002). Nesse contexto, Restrepo *et al.* (1984) mostraram que o hormônio feminino β -estradiol inibe a transição *in vitro* de *P. brasiliensis* da forma miceliana para levedura, sugerindo um potencial papel protetor desse hormônio.

A maioria dos indivíduos infectados por *P. brasiliensis* desenvolve apenas infecção assintomática, definida como paracoccidiodomicose-infecção, a qual acomete principalmente indivíduos sadios que vivem em áreas endêmicas. Já no caso do indivíduo vir a desenvolver a doença, as manifestações clínicas são diversas, sendo caracterizadas principalmente por granulomas com alta frequência de lesões pulmonares e mucocutâneas (Franco, 1987; Franco *et al.*, 1993). Nesse caso, a PCM pode dar origem a duas formas que se diferenciam quanto a características clínicas, imunológicas e histopatológicas: a forma aguda (tipo juvenil) ou a forma crônica (tipo adulto). A PCM aguda está associada a taxas de mortalidade significativas, sendo geralmente de caráter bastante severo, e acometendo, principalmente, jovens de ambos os sexos. Essa forma da doença atinge primariamente os pulmões, progredindo rapidamente por disseminação linfática e sangüínea, e comprometendo outras partes do organismo. A forma mais comum da PCM é a crônica, que se caracteriza por apresentar lesões restritas a alguns órgãos, e progredir mais lentamente. A forma crônica pode ainda acarretar seqüelas pulmonares e subcutâneas e, em casos mais graves, ou na ausência de tratamento adequado, pode vir a causar a morte do indivíduo doente. Os pacientes que desenvolvem esse tipo de manifestação clínica da doença são principalmente adultos do sexo masculino (Franco, 1987; Brummer *et al.*, 1993; Camargo & Franco, 2000).

A PCM é caracterizada por ser uma doença de padrão granulomatoso, sendo o granuloma a lesão fundamental que ocorre na PCM e apresentando-se como componente essencial na defesa anti *P. brasiliensis*. Essa lesão resulta de uma reação de hipersensibilidade tardia (DTH) contra antígenos do agente infeccioso, ocorrendo também em outras doenças infecciosas, como tuberculose, hanseníase e histoplasmose. O desenvolvimento do granuloma permite a contenção do patógeno, impedindo sua disseminação pelo organismo (Romani, 1997). O macrófago é a principal célula integrante

do granuloma, apresentando atividades microbicidas e de apresentador de antígeno, além de, juntamente com linfócitos T, produzir citocinas. Plasmócitos, eosinófilos e fibroblastos também estão presentes no granuloma (de Brito & Franco, 1994). A atividade de linfócitos T e a resposta granulomatosa são características das formas localizadas da infecção, enquanto que nas formas disseminadas não se observa formação de granulomas epitelióides (San-Blas & Niño-Vega, 2001; Murphy, 1998).

O desenvolvimento da PCM está associado, principalmente, à virulência do fungo e à resistência do hospedeiro (Kashino *et al.*, 2000). O padrão do granuloma formado em resposta a diferentes isolados de *P. brasiliensis* em modelos experimentais de infecção exemplifica o fator relacionado à virulência do patógeno (Zacharias *et al.*, 1986; Singer-Vermes *et al.*, 1989). Já a resistência do hospedeiro à infecção por *P. brasiliensis* está relacionada à formação de um granuloma epitelióide compacto e à capacidade de desenvolver uma resposta imunológica celular efetiva (Franco, 1987; Franco *et al.*, 1993). A resistência também tem sido associada ao papel do interferon gama (IFN- γ) (Cano *et al.*, 1998), importante na ativação dos macrófagos para a produção de óxido nítrico (NO), que atua como o principal agente microbicida contra *P. brasiliensis* (Bocca *et al.*, 1998). O IFN- γ também estimula macrófagos infectados por *P. brasiliensis* a secretar fator de necrose tumoral (TNF- α), necessário para a persistência do granuloma (Souto *et al.*, 2000).

Na PCM observa-se uma extensa variação da resposta imunológica. As diferentes citocinas secretadas estimulam uma resposta imunológica predominantemente celular (tipo 1) ou humoral (tipo 2), uma vez que as citocinas produzidas pelos linfócitos Th1 e Th2 são mutuamente inibitórias. A utilização de modelo murino experimental e a caracterização de linhagens resistentes e suscetíveis ao fungo *P. brasiliensis* vêm permitindo um maior entendimento da resposta protetora do hospedeiro contra esse patógeno (Calich *et al.*, 1985). Em camundongos resistentes, verificou-se uma infecção caracterizada pela ativação de macrófagos e neutrófilos, sendo evidenciada pelo aumento da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), manutenção da produção do ânion superóxido (O₂⁻), e baixos níveis de produção de anticorpos específicos para *P. brasiliensis*. Além disso, esses animais apresentaram uma produção inicial de altos níveis de IFN- γ e pequena quantidade de

citocinas do tipo 2 (IL-4, IL-5 e IL-10). Já em camundongos suscetíveis foram detectados níveis mínimos e transitórios de IFN- γ e produção relativamente alta de IL-5 e IL-10. A citocina IL-4 foi detectada apenas de forma transitória na fase mais tardia da infecção, o que dificulta afirmar que a suscetibilidade esteja exclusivamente ligada ao desencadeamento de uma resposta imunológica tipicamente do tipo 2 (Calich & Kashino, 1998; Kashino *et al.*, 2000).

Na PCM humana foi observado um padrão de produção de citocinas e resistência similar aquele verificado em infecção experimental de camundongo. Pacientes com as formas crônica e aguda da PCM, bem como indivíduos sadios sensibilizados para *P. brasiliensis*, foram avaliados quanto ao padrão de síntese de citocinas. Os indivíduos sadios demonstraram uma produção substancial de IL-2, IFN- γ e IL-10, enquanto que os pacientes apresentaram baixos níveis de IL-2 e IFN- γ e níveis elevados de IL-10 (Benard *et al.*, 2001). Fornari *et al.* (2001) verificaram que soro de pacientes com a doença disseminada apresentavam altos níveis de IL-10, TNF- α e IL-2 e pequena produção de IFN- γ . Esses e outros estudos sugerem que a resposta imunológica celular, caracterizada pela produção de citocinas do tipo 1 (IFN- γ , IL-12) parece ser o principal mecanismo de defesa contra *P. brasiliensis*. (Cano *et al.*, 1998; Souto *et al.*, 2000; Arruda *et al.*, 2002).

A resposta imunológica celular, bem como a formação de lesões granulomatosas, fornece uma resposta protetora máxima (migração, diferenciação e ativação de macrófagos) contra patógenos intracelulares (Rumbley & Phillips, 1999). Esse aspecto é particularmente importante para *P. brasiliensis*, uma vez que esse fungo pode se apresentar como um patógeno intracelular facultativo, capaz de sobreviver e se replicar no interior de células epiteliais e de macrófagos murinos e humanos não ativados (Brummer *et al.*, 1989; Moscardi-Bacchi *et al.*, 1994). Após o mecanismo de fagocitose, *P. brasiliensis* é exposto a moléculas antimicrobianas no interior das células fagossíticas hospedeiras. A persistência do fungo nesse ambiente inóspito pode estar relacionada a diversos mecanismos que caracterizam a virulência do patógeno, tais como resistência aos compostos antimicrobianos e adaptação aos metabólitos presentes no interior do fagossomo (Schnappinger *et al.*, 2003).

2. Virulência

A virulência fúngica é descrita como um evento altamente complexo, resultante da expressão de múltiplos genes em diferentes estágios da infecção e cuja consequência poderia estar fortemente associada ao estabelecimento da patogênese. As etapas de adesão e a sobrevivência do patógeno no interior do hospedeiro mostram-se essenciais no estabelecimento da patogênese. Nesse contexto, fatores importantes para o estabelecimento da infecção por fungos patogênicos vêm sendo descritos, embora apenas recentemente os mecanismos genéticos e moleculares envolvidos na expressão desses genes de virulência começaram a ser investigados (Kwon-Chung, 1998; Odds *et al.*, 2001; Yang, 2003).

O protocolo padrão utilizado na identificação de potenciais fatores de virulência é a mutagênese sítio-dirigida, que permite o estudo de cepas mutantes específicas, e a correspondente cepa reconstituída, em modelo de infecção animal. Baseando-se no “Postulado molecular de Koch”, Falkow (1988 e 2004) definiu que para um gene ser considerado de virulência, a infecção ou patogênese causada pelo mutante deve ser atenuada quando comparada à infecção causada pelo tipo selvagem e pela cepa reconstituída. Esse conceito ficou conhecido como “Postulado de Falkow”. Uma das principais etapas visando ao melhor entendimento das bases moleculares da interação hospedeiro-patógeno relaciona-se à identificação dos genes de virulência do organismo patogênico. Nesse contexto insere-se um dos grandes interesses do nosso grupo de pesquisa. postulou

Para *P. brasiliensis*, pouco é conhecido a respeito de seus fatores de virulência, uma vez que não há sistemas de transformação e ruptura gênica bem estabelecidos para esse microrganismo. Entretanto, o Projeto Genoma Funcional e Diferencial de *P. brasiliensis*, desenvolvido recentemente em nosso laboratório junto à Rede Genoma Centro-Oeste (Felipe *et al.*, 2003 e 2005), permitiu a identificação de ortólogos de genes descritos para outros fungos patogênicos como importantes no processo de infecção, virulência, resistência a drogas e dimorfismo, entre outros. O objetivo principal desse projeto foi a geração de uma biblioteca de ESTs (do inglês “Expressed Sequence Tags”) das formas

leveduriforme e miceliana de *P. brasiliensis*, visando ao mapeamento de seu transcriptoma na condição de cultivo *in vitro*. Foram geradas um total de 19718 ESTs, sendo 16351 agrupadas em 2655 “contigs” e o restante descrito como “singlets” ou seqüências únicas, constituindo um total de 6022 PbAEST (do inglês “*P. brasiliensis* Assembled Expressed Sequence Tags”). Do total de PbAESTs obtidas, 69,4% mostraram similaridade com seqüências já descritas de outros organismos, depositadas em bancos de dados. Análises utilizando-se ferramentas de bioinformática permitiram categorizá-las em 12 grupos, de acordo com a provável função, como mostrado na figura 1 (Felipe *et al.*, 2003 e 2005).

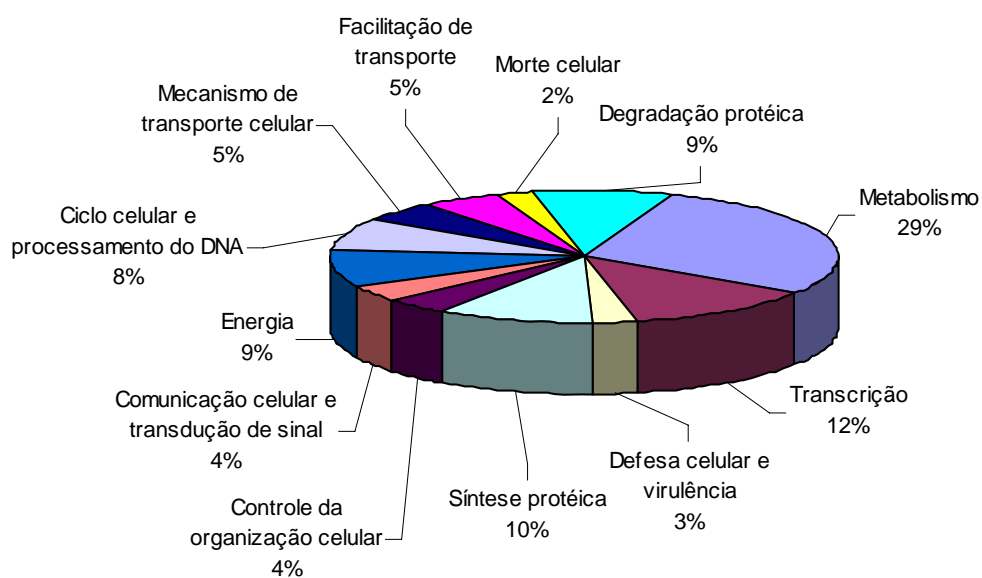


Figura 1. Principais categorias estabelecidas para os transcritos identificados pelo Projeto Genoma Funcional e Diferencial de *P. brasiliensis*, conforme descrito por Felipe *et al.* (2003 e 2005). As PbAESTs que apresentaram similaridade com seqüências depositadas em bancos de dados foram categorizadas em 12 grupos de acordo com suas prováveis funções (Modificado de Felipe *et al.*, 2005).

É importante ressaltar que, paralelamente, outro projeto genoma da forma de levedura de *P. brasiliensis*, também cultivado *in vitro*, foi empreendido por Goldman *et al.* (2003). Os dados obtidos por esses dois projetos permitiram a identificação de genes envolvidos em diversos processos biológicos de relevância para um melhor entendimento das relações hospedeiro-patógeno. Nesse contexto, foram encontrados 30 genes ortólogos a

genes descritos previamente como sendo fatores de virulência de outros organismos patogênicos, segundo o “Postulado de Falkow”. Dentre estes, destacam-se genes relacionados ao metabolismo, síntese de parede celular e detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), além de outros determinantes de virulência (Felipe *et al.*, 2005; Tavares *et al.*, 2005). A tabela 1 mostra algumas PbAESTs obtidas no projeto transcriptoma de *P. brasiliensis* que apresentaram similaridade a genes descritos como fatores de virulência nos fungos dimórficos e patogênicos *C. albicans* e *H. capsulatum*, segundo o postulado de Falkow (Tavares *et al.*, 2005).

Tabela 1. Genes de virulência descritos em *C. albicans* e/ou *H. capsulatum* e identificados no Transcriptoma de *P. brasiliensis* (Retirado de Tavares *et al.*, 2005).

PbAEST	Gene	<i>Candida albicans</i>		<i>Histoplasma capsulatum</i>	
		Nº de acesso	e-value	Contig ¹	e-value
Parede Celular					
4346	<i>chs3</i>	P30573	7e-22	3.18	2.1e-52
4988	<i>ags1</i>	-	-	0.129	2.1e-49
Metabolismo					
1688	<i>icl1</i>	AAF34690	1e-104	0.199	1.2e-119
829	<i>mls1</i>	AAF34695	2e-88	2.61	7.5e-176
Detoxificação					
621	<i>cat1</i>	CAA07164	1e-172	4.47	3.5e-138
1098	<i>aox1</i>	AAF21993	8e-26	4.95	30e-73
2509	<i>sod1</i>	AAC12872	2e-56	27.7	4.6e-51
Outros determinantes					
3306	<i>plb1</i>	AAF08980	2e-38	54.1	1.8e-66
2456	<i>ure1</i>	-	-	4.67	6.8e-81

¹Número de acesso: http://www.genome.wustl.edu/blast/histo_client.cgi

2.1. Parede Celular

A parede celular de fungos, composta essencialmente por carboidratos (quitina e glucana), glicoproteínas e proteínas, é essencial para a viabilidade do microrganismo, protegendo células fúngicas do meio externo. Por ser descrita como uma das principais diferenças entre células de mamíferos e células de fungos, enzimas essenciais para a biossíntese de precursores da parede celular são consideradas alvos para drogas antifúngicas, além de estarem correlacionadas com a virulência do organismo (Selitrennikoff & Nakata, 2003).

Em *P. brasiliensis*, a composição da parede celular varia entre as diferentes formas. A forma de levedura possui uma maior quantidade de quitina (37 a 48%) quando comparada à forma miceliana (7 a 18%). Em contrapartida, a parede celular da forma miceliana é mais rica em proteínas (24 a 41%), enquanto a parede das leveduras possui apenas 7 a 14% de constituintes protéicos (Kanetsuna *et al.*, 1969). O aumento significativo na quantidade de quitina em levedura de *P. brasiliensis*, que é a forma responsável pela efetiva colonização do hospedeiro, nos permite supor que enzimas relacionadas à biossíntese desse componente da parede celular são potenciais fatores de virulência desse fungo. Esse fato é confirmado em estudos com *C. albicans*, nos quais foi mostrado que isolados mutantes para o gene da quitina sintase 3 (*chs3*) apresentam virulência atenuada (Bulawa *et al.*, 1995). No transcriptoma de *P. brasiliensis* foi possível identificar um gene homólogo ao gene *chs3* (tabela 1), além de outras enzimas da via de síntese de quitina (Felipe *et al.*, 2005; Tavares *et al.*, 2005). A importância dos constituintes polissacarídicos da parede celular de *P. brasiliensis*, como quitina e β -glucana, na proteção do fungo, na interação patógeno-hospedeiro, bem como na modulação da resposta imunológica, reforçam o provável papel das enzimas da via biossintética desses constituintes como fatores de virulência (San-Blas & San-Blas, 1977; Figueiredo *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 1997).

Outro aspecto interessante é a correlação existente entre a composição de polissacarídeos da parede celular de *P. brasiliensis* e o processo de transição morfológica e a virulência desse fungo (San-Blas & San-Blas, 1994). Na fase miceliana a β -glucana é o

principal polímero de glicose que compõe a estrutura da parede celular. Já na fase leveduriforme a α -glucana é o principal polímero de glicose presente (95%), indicando um possível papel desse polissacarídeo na virulência do fungo (Kanetsuna & Carbonell, 1970). Nesse sentido, dados da literatura descrevem a correlação entre um menor conteúdo de α -glucana na parede celular de leveduras de *P. brasiliensis* com a respectiva diminuição da virulência desse patógeno (San-Blas & San-Blas, 1977; Hallak *et al.*, 1982). Recentemente, Rappleye *et al.* (2004) demonstraram o papel da enzima α -glucana sintase (AGS1) na virulência do fungo patogênico *H. capsulatum*. O silenciamento do gene *ags1* via interferência por RNA originou leveduras significativamente menos virulentas e com menor capacidade de colonização tecidual utilizando-se modelo de infecção murino. O ortólogo ao gene *ags1* de *H. capsulatum* foi identificado em *P. brasiliensis* (tabela 1), sendo também proposto como um fator de virulência em potencial (Felipe *et al.*, 2005; Tavares *et al.*, 2005).

2.2. Metabolismo - Ciclo do Glioxalato

O papel de alguns genes metabólicos na virulência de microrganismos patogênicos é notável. Nessa classe de determinantes de virulência encontram-se enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos, na biossíntese de lipídeos, e na assimilação de fontes de carbono (Navarro-Garcia *et al.*, 2001). Dentre as vias metabólicas relacionadas com a virulência de organismos patogênicos destaca-se o Ciclo do Glioxalato.

O ciclo do glioxalato já foi relatado em bactérias, plantas e fungos, e permite a utilização de compostos de dois carbonos como fonte para síntese de glicose (Lorenz & Fink, 2001). Esse ciclo é um desvio do Ciclo do Ácido Cítrico (figura 2) que, por fim, disponibiliza substratos para as reações de biossíntese. Em um primeiro passo, a enzima isocitrato liase catalisa a clivagem do isocitrato em succinato e glioxalato. Posteriormente, ocorre uma reação de condensação do glioxalato com acetil-CoA para a formação de malato pela ação da enzima malato sintase (Lehninger *et al.*, 2000). As enzimas isocitrato liase (*icl*) e malato sintase (*mls*), além de serem reguladoras do ciclo do glioxalato, são promissores alvos para drogas, já que essa via parece ser importante para o crescimento de

alguns patógenos e não está presente no metabolismo de animais (Lorenz & Fink, 2001; Selitrennikoff & Nakata, 2003).

A importância do ciclo do glioxalato foi mostrada na virulência de alguns patógenos intracelulares, como *Mycobacterium tuberculosis* e *C. albicans*. Após fagocitados, esses patógenos induzem a expressão de genes relacionados às enzimas desse ciclo. A ativação das enzimas ICL1 e MLS1 nessa situação permite a produção de energia por esses organismos a partir de compostos de dois carbonos (C2), como acetato, produto da degradação de ácidos graxos, uma vez que o interior de macrófagos é um ambiente pobre em carboidratos (Finlay & Falkow, 1997; Lorenz & Fink, 2001). Ainda, em modelo murino de infecção, isolados mutantes de *C. albicans* para o gene *icl1* tiveram seu caráter virulento extremamente reduzido, fortificando a correlação entre a expressão desse gene e a virulência do fungo (Graham *et al.*, 1999; Lorenz & Fink, 2001; Schnappinger *et al.*, 2003).

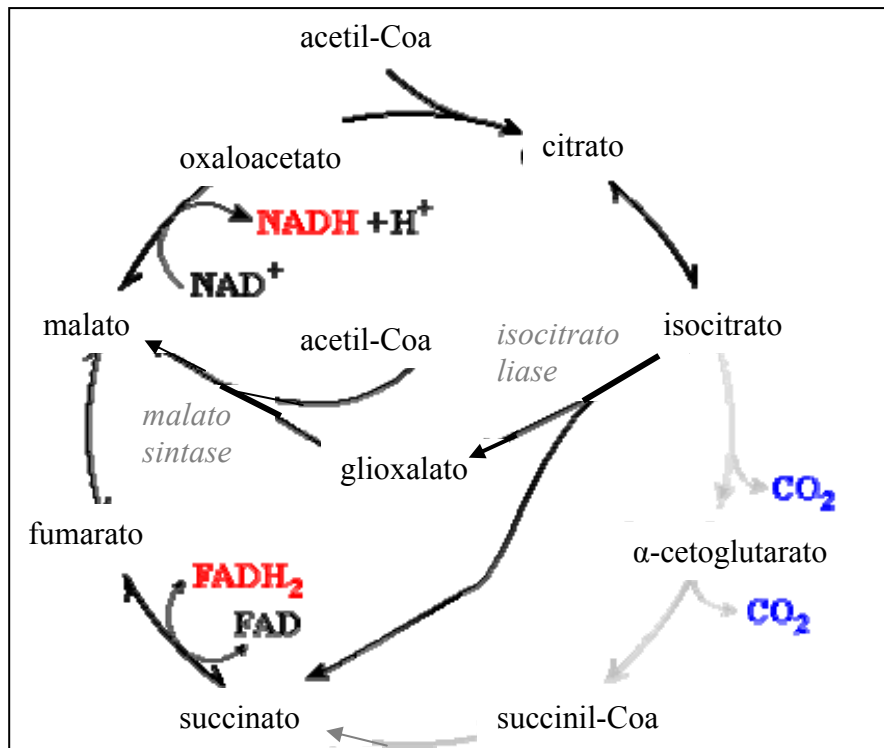


Figura 2. O ciclo do glioxalato, regulado pelas enzimas isocitrato liase e malato sintase, e sua relação com o ciclo do ácido cítrico (ciclo maior). Adaptado de Lehninger *et al.* (2000).

No transcriptoma de *P. brasiliensis* (Felipe *et al.*, 2003 e 2005) foram identificados genes ortólogos aos genes *icl1* e *mls1* de *C. albicans* (tabela 1), que codificam as enzimas chaves do ciclo do glioxalato. Esses genes também são apontados como fortes candidatos a fatores de virulência já que *P. brasiliensis*, por apresentar-se como um patógeno intracelular facultativo, também deve utilizar mecanismos que permitam sua sobrevivência no interior dessas células fagocitárias. Além disso, análises por “Northern blot” mostraram um aumento significativo na expressão do gene *icl1* em células leveduriformes de *P. brasiliensis* quando comparada à expressão do referido gene pela forma miceliana desse organismo (Felipe *et al.*, 2005). Essas análises comparativas entre os níveis de expressão dos dois tipos celulares de *P. brasiliensis* sugerem ainda um desvio do metabolismo aeróbico para o anaeróbico quando da transição micélio-levedura, que poderia ser correlacionado a uma adaptação semelhante àquela que deve ocorrer quando na interface de interação com o hospedeiro (Felipe *et al.*, 2005).

Posteriormente análises computacionais de seqüências obtidas no projeto Genoma Funcional de *P. brasiliensis* permitiram a identificação de pelo menos duas contigs que apresentaram alta similaridade com seqüências já depositadas em bancos de dado correspondentes ao gene *icl* de outros organismos (dados obtidos na dissertação de mestrado de Luciano Procópio, em preparação). A contig denominada PbAEST 1688 (tabela 1) será apontada nesse trabalho como o provável gene *icl1* de *P. brasiliensis*. A outra contig relacionada ao gene *icl* será aqui tratada como um possível gene *icl2* desse organismo.

A existência de mais de uma isoforma da enzima isocitrato liase foi recentemente relatada em *Mycobacterium tuberculosis* por Muños-Eliás & McKinney (2005). Os mesmos autores mostraram que o duplo mutante *icl1/icl2* apresenta uma menor virulência quando comparado ao tipo selvagem e ao mutante reconstituído. Na levedura *Saccharomyces cerevisiae* também foi identificado um segundo gene *icl2* que inicialmente parecia se tratar de uma isoforma não funcional da enzima isocitrato liase (Heinisch *et al.*, 1996). Estudos subseqüentes, entretanto, mostraram que o gene em questão codifica a enzima 2-metil isocitrato liase, importante no ciclo do metilcitrato (Luttik *et al.*, 2000). O

ciclo do metilcitrato está envolvido no metabolismo de propionil-CoA, no qual o 2-metilisocitrato é convertido em succinato e piruvato pela ação da enzima 2-metil isocitrato liase (Tabuchi & Uchiyama, 1975). A reação catalisada por essa enzima é similar à catalisada pela isocitrato liase, sendo que a diferença básica entre o ciclo do metilcitrato e o ciclo do glioxalato está na utilização preferencial de compostos de três carbonos (C3) para a produção de energia pelo primeiro (Luttik *et al.*, 2000).

Visando a um melhor entendimento das interações hospedeiro-patógeno, nosso grupo também vem estudando a expressão de genes de *P. brasiliensis* em modelo de infecção de macrófagos peritoniais de camundongo em cultura (tese de doutorado dos alunos Aldo Tavares e Simoneide Silva, em andamento). Nesse contexto, o RNA total de *P. brasiliensis*, após infecção de macrófagos (*ex vivo*), foi isolado e utilizado em experimentos de microarranjo de DNA para análise da expressão gênica, visando à identificação de genes do fungo *P. brasiliensis* potencialmente importantes na interface da interação hospedeiro-patógeno. Dentre os genes de *P. brasiliensis* que apresentaram um aumento significativo na expressão quando do processo de infecção em macrófagos, comparando-se à expressão gênica das formas leveduriforme e miceliana cultivadas *in vitro*, está o homólogo ao gene *ady2* de *S. cerevisiae* (comunicação pessoal, tese de doutorado dos alunos de nosso grupo Aldo Tavares e Simoneide Silva, em andamento).

Descrito por Paiva *et al.* (2004), o gene *ady2* de *S. cerevisiae* é homólogo ao gene *gpr1* de *Yarrowia lipolytica*, um componente essencial na captação de acetato pelas células fúngicas. GPR1 é uma permease transmembrânica de acetato que possui importante papel para a adaptação de *Y. lipolytica* em presença de ácido acético, apesar da expressão do respectivo gene ser apenas moderadamente reprimida em presença de glicose (Augstein *et al.*, 2003). Já a expressão de *ady2* em *S. cerevisiae* é induzida em condições de carência nutricional e reprimida na presença de glicose, supondo-se diferenças funcionais entre esses dois genes homólogos. Análises por microarranjos mostraram que o gene *ady2* de *S. cerevisiae* é essencial para o transporte de acetato, apesar de sua expressão não se mostrar necessária para a regulação da transcrição global de outros genes em resposta a essa fonte de carbono (Paiva *et al.*, 2004).

2.3. Detoxificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs)

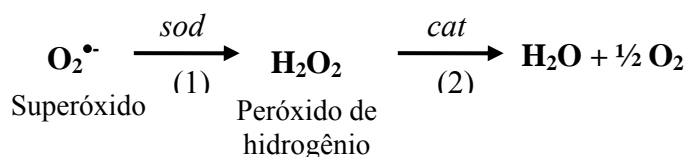
Postula-se que o fagossomo, além de ser um ambiente de carência nutricional, apresente condições extremas de estresse oxidativo devido às altas concentrações de EROs e ERNs produzidas, o que exige mecanismos de adaptação dos patógenos intracelulares (Graham *et al.*, 1999; Schnappinger *et al.*, 2003).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

A produção de ERNs representa o principal mecanismo fungicida de macrófagos ativados no combate a *P. brasiliensis*. Já o papel de EROs na proteção contra a PCM não está claro, uma vez que o fungo mostra-se resistente ao tratamento com EROs *in vitro* (Schaffner *et al.*, 1986; Brummer *et al.*, 1988). Uma possível explicação para esse relato é a presença de um sistema eficiente de neutralização dos produtos gerados pela NADPH oxidase em *P. brasiliensis*. Análises do transcriptoma desse fungo permitiram identificar ortólogos a genes de virulência relacionados a detoxificação de radicais de oxigênio e nitrogênio (tabela 1), como Cu/Zn superóxido dismutase (*sod1*), catalase (*cat1*) e oxidase alternativa (*aox1*), dentre outros (Tavares *et al.*, 2005). A ação protetora da atividade dessas enzimas vem sendo relatada em diversos fungos, como *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans* (Hwang *et al.*, 2002; Akhter *et al.*, 2003; Cox *et al.*, 2003).

As enzimas superóxido dismutases (SODs) detoxificam o radical superóxido, gerando oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A remoção do radical superóxido é importante por impedir a subsequente formação de radical hidroxil e peroxinitrito, compostos altamente tóxicos para todas as macromoléculas biológicas (Babior, 2000; Missall *et al.*, 2004). O ânion superóxido é produzido em abundância pelas células fagocitárias, compreendendo a primeira espécie reativa de oxigênio gerada no fagossomo, o que demonstra a importância da enzima SOD para a sobrevivência de patógenos intracelulares (Fridovich, 1995). Isolados mutantes para o gene *sod1* de *C. albicans* e *C. neoformans* apresentaram virulência atenuada, ressaltando a importância dessa enzima no

processo de adaptação e estabelecimento da infecção (Hwang *et al.*, 2002; Cox *et al.*, 2003).

O peróxido de hidrogênio gerado pela ação da superóxido dismutase (1) é degradado em uma reação subsequente pela catalase (2), tendo como produtos o oxigênio e a água (H₂O).



Esse mecanismo de detoxificação de H₂O₂ parece ser um importante fator de proteção de bactérias e fungos contra o estresse oxidativo gerado por células fagocitárias do hospedeiro (Kawasaki *et al.*, 1997; Wysong *et al.*, 1998; Basu *et al.*, 2004). O papel protetor da catalase foi mostrado para *C. albicans*, na qual isolados mutantes para o gene *cat1* tornaram-se mais sensíveis a ação de neutrófilos humanos, e avirulentas em modelo murino de infecção (Wysong *et al.*, 1998). Em *P. brasiliensis* uma catalase peroxissomal foi identificada e clonada (Moreira *et al.*, 2004). Foi verificado que os níveis dessa enzima são aumentados durante a transição de micélio para a levedura, e durante a exposição *in vitro* do microrganismo a H₂O₂, sugerindo um possível papel da catalase na virulência de *P. brasiliensis*.

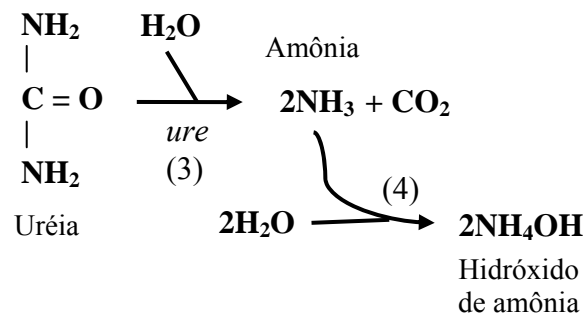
Outro gene identificado no transcriptoma de *P. brasiliensis* e que parece estar relacionado à defesa antioxidante foi o *aox1*, que codifica uma oxidase alternativa. Essa enzima foi encontrada em muitos fungos patogênicos, incluindo *C. neoformans*, *C. albicans*, *H. capsulatum* e *A. fumigatus* (Huh & Kang, 1999 e 2001; Johnson *et al.*, 2003). A oxidase alternativa é enzima de uma via respiratória complementar que recebe elétrons diretamente da ubiquinona, reduzindo oxigênio em água, e produzindo aproximadamente um terço (1/3) do ATP gerado pelo funcionamento completo da cadeia de transporte de

elétrons. Seu papel antioxidante é postulado uma vez que o óxido nítrico mostra-se um potente inibidor da citocromo *c* oxidase, mas não atua sobre a oxidase alternativa, permitindo assim a manutenção do fluxo de elétrons na membrana mitocondrial (Missall *et al.*, 2004). Foi mostrado recentemente que isolados de *C. neoformans* mutantes para o gene *aox1* apresentaram maior susceptibilidade ao estresse oxidativo *in vitro* e menor taxa de mortalidade em modelo murino de infecção via inalação (Akhter *et al.*, 2003).

2.4. Outros determinantes de virulência

Enzimas hidrolíticas, como proteinases e fosfolipases, também parecem ser importantes fatores de virulência de fungos patogênicos. Estas enzimas quando secretadas permitem o rompimento de membranas celulares do hospedeiro e da matriz extracelular, facilitando a disseminação e a invasão de outros tecidos pelo microrganismo. Dentre essas hidrolases destaca-se a fosfolipase B (*PLB1*), cujo ortólogo do gene de *C. albicans* foi encontrado no transcriptoma de *P. brasiliensis* (Tavares *et al.*, 2005). Ibrahim *et al.* (1995) demonstraram que isolados de *C. albicans* cuja atividade de PLB foi aumentada mostraram-se mais virulentos em modelo de infecção murino, enquanto que isolados mutantes ($\Delta plb1$) tiveram sua virulência significativamente atenuada quando comparados ao tipo selvagem e ao mutante reconstituído. Esses resultados demonstram a importância do gene *plb1* para o estabelecimento da infecção (Leidich *et al.*, 1998; Mukherjee *et al.*, 2001). O papel da fosfolipase B como um fator de virulência também foi relatado para *C. neoformans* (Santangelo *et al.*, 1999; Cox *et al.*, 2001).

Outro potencial fator de virulência identificado no transcriptoma de *P. brasiliensis* corresponde ao gene da urease (*ure*), enzima que catalisa a hidrólise da uréia (3), gerando dióxido de carbono (CO₂) e amônia (NH₃). A amônia reage com a água (4) formando hidróxido de amônia (NH₄OH). Em condições fisiológicas, a amônia pode resultar em um aumento do pH, importante em ambiente onde o pH seja ácido (Mobley *et al.*, 1995).



A urease é descrita como um importante fator de virulência da bactéria *Helicobacter pylori*, o principal agente causador de úlceras gástricas e duodenais em humanos (Lee *et al.*, 1993; Mera, 1995). É proposto que essa enzima atue no micro-ambiente gastro-intestinal, elevando o pH do meio e, assim, permitindo a sobrevivência de *H. pylori* na mucosa gástrica e, conseqüentemente, o estabelecimento da infecção. De fato, o papel da urease na colonização dessa bactéria em modelos experimentais já foi relatado (Eaton & Krakowka, 1994; Tsuda *et al.*, 1994). A urease vem sendo também descrita como fator de virulência de fungos patogênicos como *C. neoformans* e *Coccidioides posadasii*, para os quais foi mostrado que camundongos infectados com isolados mutantes para o gene *ure1* apresentam menor taxa de mortalidade quando comparados aos animais infectados com o tipo selvagem (Cox *et al.*, 2000; Mirbod-Donovan *et al.*, 2006). Uma vez que a transcrição do gene *ure* em *H. pylori* é induzida em resposta a condições de baixo pH (Akada *et al.*, 2000; Pflock *et al.*, 2005), admite-se uma possível regulação desse gene por pH em outros microrganismos que sejam submetidos a ambientes ácidos no processo da infecção. Apesar do pouco conhecimento sobre a regulação da expressão do gene *ure1* de fungos, os dados relatados acima ilustram a importância do estudo desse gene em microrganismos como *P. brasiliensis*, o qual é um patógeno intracelular facultativo.

Embora a inexistência de um sistema de ruptura gênica bem estabelecido para *P. brasiliensis* dificulte o estudo sobre a importância dos genes descritos acima na virulência desse patógeno, sugerimos, com base em relatos da literatura para outros microrganismos patogênicos ao homem, que tais genes possam ser considerados como potenciais fatores de

virulência desse fungo (Felipe *et al.*, 2005; Tavares *et al.*, 2005). Dentre os candidatos a fatores de virulência de *P. brasiliensis*, estão alguns genes que podem participar dos mecanismos envolvidos com a sobrevivência do fungo no interior de macrófagos, uma vez que tal ambiente parece representar uma condição de estresse ao patógeno. Acredita-se que tais fatores de virulência tenham sua expressão regulada de forma a permitir a replicação e/ou a manutenção do microrganismo nesse ambiente inóspito. Esses fatores, possivelmente, no ambiente natural de *P. brasiliensis*, foram selecionados por promoverem vantagens ao fungo em sobreviver no interior de predadores como amebas e nematóides (Casadevall *et al.*, 2003). Apesar do fagossomo ser uma organela de difícil estudo, e seu ambiente bioquímico ser pouco conhecido, sugere-se uma carência de carboidratos em seu interior, possuindo ácidos graxos como principal fonte de carbono (Lorenz & Fink, 2001). Outros aspectos como disponibilidade reduzida de íons ferro e pH ácido, além de um ambiente propício ao estresse oxidativo e à ocorrência de danos no material genético e no envelope celular, também vem sendo inferidos para tal organela (Schnappinger *et al.*, 2003).

Atualmente, nosso grupo tem apresentado bastante interesse no estudo de potenciais genes de virulência de *P. brasiliensis*. Nesse contexto, estudos por meio de microarranjos de DNA vêm sendo feitos com o objetivo de verificar a expressão de genes de *P. brasiliensis* recuperado do interior de macrófagos infectados, comparando-se com a expressão dos mesmos genes quando do crescimento do fungo em condições convencionais de cultivo *in vitro* (Tese de doutorado dos alunos Aldo Tavares e Simoneide Silva, em andamento). Adicionalmente, empreendemos, no trabalho de minha dissertação de mestrado, a análise comparativa da expressão *in vitro* de alguns dos potenciais genes de virulência, submetendo-se o fungo a condições de estresse compatíveis àquelas provavelmente encontradas no interior de células fagocitárias. Possivelmente esses estudos permitirão um melhor entendimento do papel desses fatores no decorrer da infecção, além de facilitar a compreensão dos aspectos moleculares dessa patogênese.

Objetivos e Estratégias Experimentais

Objetivo 1:

Analisar comparativamente a expressão de potenciais genes de virulência de *P. brasiliensis* quando submetido, *in vitro*, a diferentes condições de estresse que possivelmente ocorram no interior de células fagocitárias.

Estratégia experimental:

1. Crescer o fungo *P. brasiliensis* (levedura) até a fase exponencial em meio de cultura complexo.
2. Cultivar essas células por diferentes tempos em meio de cultura definido, submetendo-se o fungo a condições de estresse nutricional ou pH ácido, que potencialmente ocorram no interior do fagossomo.
3. Proceder à extração de RNA das células submetidas ao tratamento em paralelo a de seus respectivos controles.
4. Analisar a expressão dos potenciais genes de virulência em estudo (*icl1*, *icl2*, *m1s1*, *ady2* e *ure1*) comparada à expressão do gene constitutivo α - tubulina, por meio da técnica RT-PCR (do inglês “Reverse Transcriptase – Polimerase Chain Reaction”).
5. Determinar comparativamente os níveis de expressão desses genes por densitometria com o auxílio do programa “Scion Image” e proceder às respectivas análises estatísticas.

Objetivo 2:

Analisar a expressão de genes relacionados ao ciclo do glioxalato quando do co-cultivo de leveduras de *P. brasiliensis* e macrófagos murinos.

Estratégia experimental:

1. Co-cultivar o fungo *P. brasiliensis* (levedura) com macrófagos murinos da linhagem celular J774 por 9 horas. Recuperar as células fúngicas por centrifugação após lise dos macrófagos.
2. Proceder à extração do RNA total das células fúngicas e à respectiva amplificação da fração poli(A)⁺, empregando o kit “MessageAmp™ aRNA” (Ambion).
3. Analisar a expressão de genes relacionados ao ciclo do glioxalato (*icl1*, *mls1* e *ady2*) comparada à expressão do gene constitutivo α -tubulina, por meio da técnica RT-PCR (do inglês “Reverse Transcriptase – Polimerase Chain Reaction”).
4. Determinar comparativamente os níveis de expressão desses genes por densitometria com o auxílio do programa “Scion Image” e proceder às respectivas análises estatísticas.

Material

1. Meios de Cultura – *Paracoccidioides brasiliensis*

Todos os meios foram esterilizados em autoclave a 120°C por 15 min.

1.1) Meio Fava-Neto

Protease peptona	0,3 % (p/v)
Peptona	1 % (p/v)
Extrato de carne	0,5 % (p/v)
NaCl	0,5 % (p/v)
Dextrose	4 % (p/v)
Extrato de levedura	0,5 % (p/v)
Ágar	1,6 % (p/v)
Ajustou-se o pH para 7,0.	

1.2) Meio YPD

Extrato de levedura	1 % (p/v)
Glicose	2 % (p/v)
Bacto-peptona	2 % (p/v)
Ajustou-se o pH para 7,5.	

1.3) Meio MVM-glicose

Glicose	20,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,15 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 g
L-asparagina	2,0 g
^a L-cistina	0,2 g

^b Solução de vitaminas	10,0 mL
^c Solução de elementos traço	1,0 mL

Todos os reagentes, exceto as soluções de vitaminas e elementos traço, foram misturados e o volume foi completado para 1000 mL. O pH foi ajustado para 7,0 ou 4,5 (dependendo do experimento) com 5 M NaOH. As soluções de vitaminas e elementos traço foram esterilizadas por filtração usando-se membranas do tipo milipore 0,2 µm, e acrescentadas após o meio ter sido autoclavado.

^a A cistina foi dissolvida antes de ser misturada ao restante do meio de cultura em um pequeno volume de água destilada aquecida, adicionando-se 1 M NaOH até a completa dissolução.

^b A solução estoque de vitamina é composta (para 100 mL):

hidroclorato de tiamina	6,0 mg
niacina	6,0 mg
pantotenato de cálcio	6,0 mg
inositol	1,0 mg
biotina	0,1 mg
riboflavina	1,0 mg
ácido fólico	10,0 mg
cloreto de colina	10,0 mg
hipocloreto de piridoxina	10,0 mg

^c A solução estoque de elementos traço é composta (para 100 mL):

H ₃ BO ₃	5,7 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	15,7 mg
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	140,4 mg
MnSO ₄ .14H ₂ O	8,1 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	3,6 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	79,2 mg

1.4) Meio MVM-acetato

O meio MVM-acetato é composto pelos mesmos reagentes do meio MVM-glicose, sendo a glicose substituída por acetato de sódio (2 %). O pH do meio foi ajustado para 7,0.

1.4) Meio Ágar Base Uréia

Peptona	0,1 % (p/v)
Dextrose	0,1 % (p/v)
NaCl	0,5 % (p/v)
KH ₂ PO ₄	0,08 % (p/v)
Na ₂ HPO ₄	0,12 % (p/v)
Ágar	1,6 % (p/v)

Ajustou-se o pH para 7,0.

Após o meio ter sido autoclavado, esperou-se resfriar até aproximadamente 50°C e adicionou-se, para 100 mL de meio, 5 mL de uma solução de uréia 40 % (p/v). Misturou-se bem e verteu-se cerca de 20 mL de meio por placa.

2. Antibióticos

As soluções de antibióticos foram esterilizadas por filtração usando-se membranas do tipo milipore 0,2 µm, e estocados em ambiente protegido da luz, a -20°C.

2.1) Ampicilina

- Solução estoque: 500 U/mL em água destilada estéril.
- Concentração final de uso: 0,05 U/mL.

2.2) Neomicina

- Solução estoque: 200 mg/mL em água destilada estéril.
- Concentração final de uso: 20 µg/mL.

3. Solução corante Verde-Janus

- Solução estoque: 0,5% (p/v) em água destilada estéril.
- Concentração final de uso: 0,05 % (p/v).

A solução estoque do corante vital Verde-Janus foi esterilizada por filtração usando-se membranas do tipo milipore 0,2 μm .

4. Soluções utilizadas para dosagem dos níveis de açúcar redutor

4.1) Solução DNS

Ácido Dinitrosalicílico	10,0 g
NaOH 2M	200 mL
Tartarato de Sódio e Potássio	150,0 g

O DNS foi dissolvido sob aquecimento na solução de NaOH, sendo acrescentado o tartarato de sódio e potássio previamente dissolvidos em 500ml de água destilada aquecida. A solução foi deixada sob agitação e aquecimento até a completa dissolução dos reagentes. Completou-se o volume de água destilada para 1000 mL.

4.2) Solução estoque de Glicose (3 mg/mL)

Glicose	0,15 g
H ₂ O destilada	50 mL

Para a construção da curva padrão, a solução estoque de glicose foi diluída, com água destilada, para as concentrações finais de: 2,6 mg/mL; 2,4 mg/mL; 2,2 mg/mL; 2,0 mg/mL; 1,8 mg/mL; 1,6 mg/mL; 1,4 mg/mL; 1,2 mg/mL; 1,0 mg/mL; 0,8 mg/mL.

5. Solução de lavagem das células

Tampão fosfato (PBS) 10X

NaCl	1,5 M
Na ₂ HPO ₄	0,1 M
NaN ₃	0,02 %

O pH foi ajustado para 7,2.

6. Soluções utilizadas para extração de DNA genômico

6.1) Clorofane

Fenol (equilibrado em pH 7,6)	1 v
Clorofórmio	1 v
β-hidroxiquinolina	0,05 % (p/v)

A solução foi equilibrada com Tris-HCl 100 mM pH 7,6 e estocada em ambiente protegido da luz. A manipulação foi feita com luvas e o descarte foi feito independente por tratar-se de solvente orgânico (Sambrook & Russel, 2001).

6.2) Solução estoque de RNase A

RNase A	20mg/μL
---------	---------

A solução foi preparada em água Milli Q livre e aquecida a 100°C durante 20 min.

A solução foi estocada a -20°C.

6.3) Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

7. Soluções livres de RNase

Todos os reagentes e águas utilizados no preparo de soluções para o uso em experimentos com RNA estavam em condições livres de RNase, preparados conforme descrito por Sambrook & Russel (2001).

8. Enzimas utilizadas

- *Taq* DNA polimerase – 2 U/ μ L (Cenbiot-RS)
- DNase I livre de RNase – 1U/ μ L (Promega)
- SuperScript II Transcriptase Reversa – 200 U/ μ L (Invitrogen)

9. Tampões de enzimas

9.1) Tampão da *Taq* DNA Polimerase 10X

Tris-HCl pH 8,3	0,1 M
KCl	0,5 M
MgCl ₂	15 mM
BSA	0,1 % (p/v)

9.2) Tampão da DNase I 10X

Tris-HCl pH 7,8	0,4 M
MgSO ₄	0,1 M
CaCl ₂	10 mM

9.3) Tampão da SuperScript II Transcriptase Reversa 5X

Tris-HCl pH 8,3	0,25 M
KCl	0,375 M
MgCl ₂	15 mM

10. Soluções para eletroforese em géis de agarose

10.1) Tampão de Corrida Tris-EDTA-borato (TEB) 10X

Trizma base	0,89 M
Ácido bórico	0,89 M
EDTA	0,02 M

O pH foi ajustado para 8,0 com ácido bórico.

10.2) Tampão de Amostra para DNA/RNA (10X)

Glicerol	50 % (v/v)
Azul de bromofenol	0,1 % (p/v)
Xileno cianol	0,1 % (p/v)

10.3) Solução de Brometo de Etídio

- Solução estoque: 10 mg/mL em água destilada.
- Concentração final de uso: 0,5 µg/mL.

11. Marcadores de massa molecular (MM)

-“**100 bp DNA Ladder**” (Invitrogen Life Technologies, nº de catálogo: R310-011) - Fragmentos de DNA de 100 a 1500 pb.

-“**100 bp DNA Step Ladder**” (Promega, nº de catálogo: G6951) - Fragmentos de DNA de 100 a 4000 pb.

Metodologia

1. Manutenção e cultivo do fungo *P. brasiliensis*

1.1) Condição de manutenção e cultivo do fungo para obtenção de DNA genômico e RNA total visando à padronização dos experimentos

O isolado *Pb01* do fungo *P. brasiliensis* na forma leveduriforme foi mantido regularmente em meio sólido Fava-Neto, em estufa à temperatura de 36,5°C. O fungo era repicado semanalmente, sendo passado para novo tubo contendo meio de cultura.

Alternativamente, o fungo *P. brasiliensis* na forma de levedura foi cultivado em meio líquido YPD (Yeast-Peptone-Dextrose) a 36,5° C e crescido por aproximadamente 7 dias sob agitação (130 rpm) para obtenção de quantidade de células suficiente para extração de ácidos nucleicos.

1.2) Condição de pré-cultivo para obtenção de RNA total para análise dos níveis de expressão dos potenciais fatores de virulência

As condições de pré-cultivo a serem utilizadas nos experimentos foram estabelecidas a partir de uma curva de crescimento em meio YPD, contando-se o número de células viáveis diariamente em Câmara de Neubaer por um período de 10 dias, e monitorando-se os níveis de açúcar redutor presente no meio de cultura. Nesse sentido, inoculou-se $2,5 \times 10^7$ células leveduriformes do isolado *Pb01* de *P. brasiliensis* em 100 mL de meio complexo YPD contendo 0,05 U/mL de penicilina e 20 µg/mL de neomicina. O fungo foi cultivado por 10 dias a 36,5° C sob agitação (130 rpm). Para a contagem do número de células viáveis utilizou-se o corante vital Verde-Janus (0,05%), descrito por Gohman-Yahr *et al.* (1980), na razão de 1:1 amostra-corante. O monitoramento da quantidade de açúcar redutor presente no meio foi feito mediante ensaio de DNS (Ácido Dinitrosalicílico) e está descrito no item 2 da metodologia. Esses experimentos, realizados em triplicata, tiveram como objetivo determinar o tempo ideal de cultivo do fungo, assegurando que todos os tratamentos fossem feitos partindo-se de um inóculo de células na

fase logarítmica (fase log) de crescimento que não tivessem sido submetidas a uma condição prévia de carência nutricional.

2. Dosagem dos níveis de açúcar redutor

Para a dosagem dos níveis de açúcares redutores presentes no meio de cultivo durante o crescimento de *P. brasiliensis* em YPD, foi construída, primeiramente, uma curva padrão utilizando-se soluções de glicose nas concentrações de 0,8 a 2,6 mg/mL conforme especificado na tabela 2.

Tabela 2. Ensaio realizado em diferentes concentrações de glicose para a construção da curva de calibração a ser utilizada nos experimentos para determinação da quantidade de açúcar redutor presente no meio.

Reagentes	Teste	Branco
Solução de Glicose (0,8 a 2,6 mg/mL)	100µL	-
H ₂ O	900µL	1000µL
DNS	1500µL	1500µL

As amostras foram fervidas por 5 minutos e resfriadas em banho de água fria. Em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro (UV/Visible Spectrophotometer Ultrospec 2000 – Amersham®) a 540 nm e os resultados obtidos foram plotados em gráfico (Absorbância X Concentração de Glicose). A amostra intitulada branco foi utilizada como padrão para as leituras no espectrofotômetro. Os experimentos para a obtenção da curva padrão foram feitos em triplicata.

Procedimento similar foi realizado utilizando-se amostras do meio de cultivo de *P. brasiliensis*, retiradas diariamente durante o período de crescimento do fungo. Os resultados da OD₅₄₀ para as referidas amostras foram aplicados na equação de reta obtida a partir da curva padrão.

3. Cultivo *in vitro* do fungo em condições que potencialmente mimetizam o interior do fagossomo

3.1) Cultivo de *P. brasiliensis* em condição de estresse nutricional

Após crescimento pelo período estabelecido de 6 dias em meio YPD (item 1.2), as células leveduriformes foram coletadas a partir da centrifugação de 10 mL da cultura (3000 rpm (1550 g) / 3 min / TA / Rotor 224 / Centrífuga IEC). O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com tampão PBS 1X estéril, centrifugando-se como descrito acima. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio Mac Veigh-Morton (MVM) (Restrepo & Jimenez, 1980) contendo, como única fonte de carbono, 2 % de glicose, para experimentos controle, ou 2 % de Acetato de Sódio, visando simular um possível estresse nutricional como o que provavelmente ocorre no interior de células fagocitárias (Lorenz & Fink, 2002). As células em meio MVM-glicose e MVM-acetato foram coletadas após incubação a 36,5°C por três diferentes períodos de tempo (0,5 h, 1 h e 5 h), sob agitação (150 rpm). Para todos os experimentos, verificou-se, após o tempo de cultivo determinado, o número de células viáveis e a morfologia. Além disso, amostras do meio, após o cultivo do fungo, foram utilizadas para dosagem de açúcares redutores presentes, como especificado no item 2. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2) Cultivo de *P. brasiliensis* em pH exógeno ácido

O fungo *P. brasiliensis*, após crescimento por 6 dias em meio YPD (item 1.2), foi submetido a uma condição de baixo pH exógeno, visando simular a acidez existente no interior do fagossomo. Nesse sentido, 10 mL da cultura foi coletada (3000 rpm (1550 g) / 3 min / TA / Rotor 224 / Centrífuga IEC), descartando-se o sobrenadante. As células foram lavadas duas vezes com tampão PBS 1X estéril e ressuspensas em 10 mL de meio MVM-glicose, variando-se o pH. Nesse sentido, as células foram incubadas (36,5°C / 150 rpm) por diferentes períodos de tempo (0,5 h, 1 h, 5 h e 18 h) em pH 4,5, ou em condições

experimentais controle de pH 7,0. Após os tempos especificados, as células foram avaliadas quanto a viabilidade e morfologia, e o pH do meio de cultivo foi medido. Os experimentos foram feitos em triplicata.

4. Detecção da atividade da enzima urease de *P. brasiliensis*

A atividade da enzima urease de *P. brasiliensis* foi verificada inoculando-se cerca de 50 mg de fungo (peso úmido), crescido durante 6 dias em meio YPD (item 1.2), no centro de uma placa de Petri contendo 20 mL de meio Ágar Base Uréia. As células foram coletadas por centrifugação como descrito anteriormente, e lavadas duas vezes com PBS 1 X estéril antes de serem inoculadas no referido meio. O inóculo foi incubado a 37°C por 3 e 5 h. Esse meio permite a detecção rápida da hidrólise de uréia pela formação de amônia, que alcaliniza o meio promovendo a mudança de cor do mesmo para vermelho-púrpuro. Para verificar se a reação alcalina produzida no meio Ágar Base Uréia de fato está sendo causada pela atividade ureásica, foi feito um controle inoculando-se o fungo em meio desprovido de uréia.

5. Desenho dos oligonucleotídeos visando à amplificação dos genes de interesse

Foram desenhados oligonucleotídeos específicos para alguns potenciais fatores de virulência identificados no transcriptoma de *P. brasiliensis*. Dentre eles estão os preditos genes *icl1* e *icl2* (isocitrato liase 1 e 2, respectivamente), *mls1* (malato sintase), *ure1* (urease), e o provável ortólogo do gene *ady2* de *S. cerevisiae*, que codifica para uma permease de acetato. Foram também sintetizados oligonucleotídeos para amplificação de um fragmento do gene α -tubulina (*α -tub*), cuja expressão é constitutiva na fase de levedura de *P. brasiliensis*. Esse gene servirá como controle interno nos experimentos de RT-PCR semiquantitativa a serem realizados.

Os oligonucleotídeos foram desenhados com base nas seqüências obtidas pelo Projeto Transcriptoma Diferencial de *P. brasiliensis* (Felipe *et al.*, 2003 e 2005), utilizando-se o *software* Primer 3, disponível *on-line* (<http://www-genome.wi.mit.edu>). Os oligonucleotídeos foram posteriormente sintetizados pela GenScript Corporation. As características dos iniciadores utilizados nesse trabalho estão descritas na tabela 3.

Tabela 3. Dados gerais dos oligonucleotídeos sintetizados.

Iniciador	Seqüência de nucleotídeos e tamanho dos iniciadores (MER)	Tm em 50mM Na ⁺ (°C)	Tamanho do produto esperado a partir do cDNA (pares de base)
5'TUB4f	5'-TTCGTTGATCTGGACCCTTC -3' (20)	60	199
3'TUB4f	5'-GGAGGGACGAGCAGTTATCA-3' (20)	60	
5'MLSf	5'-TTCAATTTCCCTCCTGACGA-3' (20)	60	414
3'MLSr	5'-AGCTGTGGCAATGGGTTAAG-3' (20)	60	
5'UREf	5'-GTGACCACTTCCCGATGAAT-3' (20)	60	255
3'UREr	5'-GGATTGTGCGGTTCTTGAAT-3' (20)	60	
5'ICL1f	5'-GCTCACCCAGATGGTCAAAT-3' (20)	60	265
3'ICL1r	5'-AGTATCCGCATCCGCAATAA-3' (20)	60	
5'ICL2f	5'-TTGCAGCAGACGTATCCAAG-3' (20)	60	304
3'ICL2r	5'-TTCCTTCTCGAATCCCATTG-3' (20)	60	
5'ADY2f	5'-GGTTCAACTGCCCCAGTAAA-3' (20)	60	479
3'ADY2r	5'-TCCCAGCCAGTAATTGAACC-3' (20)	60	

6. Extração do DNA genômico de *P. brasiliensis*

Para posterior padronização das condições experimentais de amplificação dos genes a serem estudados, procedeu-se a extração do DNA genômico de *P. brasiliensis*. O fungo foi primeiramente crescido em condições previamente descritas no item 1.1. As células foram coletadas por centrifugação (3000 rpm (1550 g) / 5 min / TA / Rotor 224 / Centrífuga IEC), e o sobrenadante foi descartado. Cerca de 50 mg (peso úmido) de células foram macerados com nitrogênio líquido. Ao pó obtido adicionou-se 500 µl de tampão de extração (200 mM Tris-HCl pH 8,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5 % SDS). Misturou-se e agitou-se por 15 minutos em “vortex”. Ao lisado resultante foi adicionado 1 volume de clorofane, e após homogeneizar, as fases foram separadas por centrifugação a 12000 g durante 1 h a 4°C. A fase aquosa obtida após a centrifugação foi transferida para um novo tubo, adicionando-se 25 µl de RNase A (20 mg/mL) e incubando-se por 10 min a 37°C.

Em seguida, adicionou-se 1 volume de clorofórmio, misturando-se. Procedeu-se a centrifugação (12000 g / 10 min / 4°C) e coletou-se a fase aquosa resultante. Adicionou-se 0,54 volume de isopropanol e o DNA precipitado foi coletado por centrifugação (12.000 g / 5 min / 4°C). O sobrenadante foi descartado, o sedimento foi lavado duas vezes com etanol 70 % (5000 g / 5 min / 4°C) e, depois de secado a temperatura ambiente, o mesmo foi ressuspendido em 50 µl de tampão TE.

7. Padronização das condições de amplificação

Visando a ajustar as condições de PCR para a amplificação dos genes de interesse, foram feitos, para cada gene, dois sistemas, utilizando-se como molde da reação DNA genômico ou cDNA total de *P. brasiliensis*. O DNA genômico foi extraído após cultivo do fungo em meio YPD (item 1.1) utilizando-se a metodologia descrita no item 6. O cDNA total utilizado para a padronização dos experimentos de PCR foi obtido a partir de RNA total extraído de *P. brasiliensis*, crescido como especificado no item 1.1.

Para amplificação partindo-se de cerca de 20 ng de DNA genômico ou de uma alíquota correspondente a 1/5 (5 µL) da reação de síntese de cDNA (item 11.1), as condições de reação definidas, em um sistema de 25 µl, foram: tampão *Taq* DNA Polimerase 1X; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTPs; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo específico e 2U da enzima *Taq* DNA Polimerase (Cenbiot-RS/Brasil).

Os parâmetros de amplificação adotados foram:

- 1) Desnaturação inicial: 94°C / 2 minutos.
- 2) Desnaturação: 94°C / 1 minuto.
- 3) Anelamento: 60°C / 1 minuto.
- 4) Extensão: 72°C / 1 minuto.
- 5) Repetição das etapas de 2 a 4 por 30 vezes.
- 6) Extensão final: 72°C / 10 minutos.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5 %, baseando-se nas condições padrão de eletroforese descritas por Sambrook e Russel (2001), como descrito no item 8.

8. Análise de ácidos nucléicos por eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose na concentração desejada foi feito em tampão TEB 0,5X, sendo empregado o corante brometo de etídeo na concentração final de 0,5 µg/mL.

As amostras a serem analisadas foram preparadas adicionando-se tampão de amostra para uma concentração final de 1X. Após a aplicação das amostras, o gel foi submetido à eletroforese em tampão de corrida TEB 0,5X utilizando-se uma voltagem de aproximadamente 5V/cm. A visualização dos ácidos nucléicos foi feita por meio de transluminador de luz ultravioleta (UV).

9. Estabelecimento da fase exponencial de amplificação

Para posterior análise quantitativa dos níveis de expressão dos genes em estudo, determinou-se o número de ciclos correspondente à fase exponencial de amplificação. Uma vez que o número ótimo de ciclos adotado deve ser o mesmo para a amplificação do gene em estudo e do controle interno (Marone *et al.*, 2001), procedeu-se uma PCR multiplex utilizando-se, a partir de um mesmo molde, os pares de oligonucleotídeos para amplificação do gene de interesse e do gene constitutivo *α-tub*. O molde utilizado foi uma alíquota correspondendo a 1/5 do produto da reação de transcrição reversa feita a partir de 2 µg do RNA total de *P. brasiliensis* crescido em meio YPD a 36,5° C / 130 rpm (item 1.1). Para todos os genes foram feitas PCRs seguindo-se as condições descritas anteriormente, variando-se o número de ciclos (24, 27, 30, 33 e 36 ciclos). O resultado da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

10. Extração de RNA total de *P. brasiliensis*

As células cultivadas nas diferentes condições de estudo, descritas no item 3, foram coletadas por centrifugação (3000 rpm / 3 min / T.A. / Rotor 224 / Centrífuga IEC) e o sobrenadante foi descartado. Cerca de 180 mg de células (peso úmido) foram empregados para extração de RNA total. A essa massa de células foi adicionado 1mL do reagente Trizol[®] (Invitrogen) e micro pérolas de vidro (Sigma). A lise das células foi realizada por continuada agitação em “vortex” por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida, a extração do RNA total foi realizada conforme especificado pelo fabricante do reagente Trizol[®] (Invitrogen). Centrifugou-se a amostra por 1 min a 10000 g (T.A.), transferindo-se o sobrenadante para novo tubo e descartando-se os debris sedimentados (repetiu-se esse procedimento). À amostra coletada adicionou-se 200 µl de clorofórmio, misturando-se vigorosamente. Posteriormente, a mistura foi centrifugada (12.000 g / 15 min / 4°C) e a fase aquosa resultante foi transferida para novo tubo. Adicionou-se 500 µl de isopropanol e, após 10 min de incubação a temperatura ambiente, a amostra foi novamente centrifugada (12.000 g / 10 min / 4°C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes com etanol 70% (7500 g / 5 min / 4°C). Em seguida deixou-se o sedimento secando à temperatura ambiente e, posteriormente, o mesmo foi ressuspensionado em 100 µl de água Milli Q.

11. Tratamento do RNA total com DNase I livre de RNases

Após quantificação por espectrofotometria e verificação da integridade do RNA total por eletroforese em gel de agarose 1%, em condições livre de RNase (Sambrook & Russel, 2001), cerca de 10 µg do RNA total obtido foi submetido a tratamento com DNase I livre de RNase (Promega) a fim de se eliminar qualquer traço residual de contaminação por DNA genômico. As condições de tratamento com DNase I, para um volume final de 25 µL de reação, foram: Tampão da DNase I 1X; 10 U da enzima DNase I livre de RNase (Promega). O tratamento foi realizado a 37° C por 30 minutos, parando-se a reação pela adição de EDTA 2,5 mM (concentração final) e aquecendo-se a 65° C por 10 minutos.

Após precipitação padrão com etanol (Sambrook & Russel, 2001), o RNA total tratado com DNase I livre de RNase foi novamente quantificado e analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, sendo todos os procedimentos realizados em condições livres de RNase (Sambrook & Russel, 2001).

12. RT-PCR semiquantitativa

12.1) Síntese da Primeira Fita de cDNA

A reação de síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 2 µg de RNA total da forma de levedura de *P. brasiliensis* cultivado de acordo com as condições especificadas nos itens 1 e 3, e tratado com DNase I livre de RNase (como descrito no item 10). A essa quantidade de RNA total foi adicionado 0,5 µg de iniciador dT₁₂₋₁₈, sendo a mistura incubada a 70°C / 10 minutos, e imediatamente colocada no gelo por cerca de 1 minuto. Em seguida, para um volume final de 25 µL, os seguintes reagentes foram adicionados (para as concentrações finais indicadas): tampão da transcriptase reversa 1X; DTT 8 mM; dNTPs 0,4 mM cada. Após incubação a 42°C por 2 minutos, 200U da enzima transcriptase reversa (SuperScript II, Invitrogen) foram adicionadas para cada sistema, seguido de incubação a 42°C por 1 h. Finalmente, a enzima foi desnaturada aquecendo-se a 70°C por 20 minutos. Para todos os sistemas foi feito controle da RT-PCR omitindo-se a enzima transcriptase reversa, para verificar uma possível contaminação por DNA genômico.

12.2) PCR

Uma alíquota correspondente a 1/5 (5 µL) da reação de síntese de cDNA foi submetida à reação de amplificação em um volume final de 25 µL contendo: tampão *Taq* DNA Polimerase 1X; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTPs; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo (tendo sido utilizado na mesma reação um par de oligonucleotídeos específicos para um

potencial gene de virulência em estudo, e o par de oligonucleotídeos referente ao controle interno *α-tub*); 2U da enzima *Taq* DNA Polimerase (Cenbiot-RS/Brasil).

As etapas de amplificação utilizadas foram as mesmas anteriormente padronizadas (item 7), exceto pelo número de ciclos, utilizando-se 25. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5 %.

13. Análise da expressão de potenciais genes de virulência do fungo *P. brasiliensis* recuperado de macrófagos peritoniais de camundongo

Para verificação dos níveis de expressão de potenciais genes de virulência de *P. brasiliensis* quando da interação hospedeiro-patógeno, também foi utilizado, nos experimentos de RT-PCR semiquantitativa, RNA do fungo obtido a partir da co-cultura de células de leveduras de *P. brasiliensis* e macrófagos peritoniais de camundongo (linhagem Balb/C). Após o co-cultivo por um período de 6 horas, as células de macrófagos foram lisadas e o fungo recuperado por centrifugação. Sequencialmente, procedeu-se à extração do RNA total e à respectiva amplificação da fração poli(A)⁺ (MessageAmp™ aRNA Kit - Ambion). Uma alíquota do mRNA amplificado foi gentilmente cedida pelos alunos de doutorado Aldo Tavares e Simoneide Silva (tese de doutorado em andamento) para análise da expressão de alguns genes em estudo. Nesse sentido, 300 ng de mRNA foi utilizado como molde nos experimentos de RT-PCR semiquantitativa, com base no protocolo descrito no item anterior (11), diferenciando-se apenas quanto a utilização de Random Primers como iniciadores nas reações de síntese da primeira fita de cDNA (0,5 µg / reação). Como controle dos experimentos, foi utilizado RNA de *P. brasiliensis* cultivado *in vitro* em meio Fava-Neto por 7 dias, e também submetido ao procedimento de amplificação. As reações de PCR para amplificação dos genes de interesse para as análises de expressão nessas condições foram feitas em duplicata.

14. Quantificação dos níveis de expressão gênica utilizando-se o programa “Scion Image”

A análise dos resultados obtidos visando à quantificação dos níveis de expressão do gene de interesse foi feita por densitometria, utilizando-se o programa “Scion Image”, disponível no endereço da internet <http://www.scioncorp.com>. Os níveis de expressão do gene da α -tubulina, constitutivo para forma leveduriforme de *P. brasiliensis*, permitiram a normalização dos resultados. A partir dos valores obtidos por densitometria, referentes a cada fragmento de DNA amplificado, foi determinada a razão entre o nível de expressão dos potenciais genes de virulência em relação à expressão do gene controle (*α -tub*), para cada uma das condições (tratamento e controle) empregadas. Comparando-se os valores das razões obtidas (gene de interesse / *α -tub*) a partir da condição experimental (estresse nutricional, ou cultivo do fungo em pH ácido, ou ainda da co-cultura com macrófagos peritoniais de camundongos) àquelas obtidas para a condição controle de cultivo, é possível verificar se está ocorrendo regulação positiva ou negativa do gene em estudo quando da submissão do fungo a tais condições.

15. Análise estatística dos resultados

As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do programa de computador “Mynova”, versão 1.3 (S. Brooks, Copyright 1993). Os dados estão apresentados como médias +/- SEM (erro padrão da média). Para comparações entre dois dados (condição experimental X condição controle) foi utilizado o teste-t de Student, sendo considerados os valores de $P < 0,05$ como significativamente diferentes.

Resultados e Discussão

1. Estabelecimento da condição de pré-cultivo do fungo *P. brasiliensis*

Embora o fungo *P. brasiliensis* seja o agente etiológico de uma das mais prevalentes micoses sistêmicas que atinge o continente latino-americano (Franco, 1987), até o presente momento muito pouco é conhecido a respeito de seus fatores de virulência. Recentemente, os resultados obtidos pelo Projeto Genoma Funcional e Diferencial de *P. brasiliensis*, (Felipe *et al.*, 2003 e 2005) possibilitaram a identificação de ortólogos de genes envolvidos no processo de infecção e virulência em outros organismos patogênicos (Tavares *et al.*, 2005). Acredita-se que a indução desses potenciais fatores de virulência de *P. brasiliensis* pode viabilizar a sobrevivência desse patógeno intracelular facultativo perante as defesas do hospedeiro, conduzindo ao estabelecimento da infecção. O estudo da regulação da expressão desses candidatos a fatores de virulência facilitará a compreensão do papel desses genes no processo de infecção, bem como o entendimento dos mecanismos adotados pelo fungo para o escape do sistema de defesa do hospedeiro.

No intuito de verificar os níveis de expressão de alguns genes que possivelmente possam estar relacionados à habilidade de *P. brasileiensis* em sobreviver e se replicar no interior de macrófagos, estabeleceu-se primeiramente as condições de cultivo a serem empregadas visando aos experimentos seguintes, nos quais o fungo será submetido a diferentes tratamentos que potencialmente mimetizam o interior do fagossomo. Nesse sentido, foi feita uma curva de crescimento em meio complexo YPD do isolado *Pb01* de *P. brasiliensis* na forma de levedura, inoculando-se $2,5 \times 10^7$ células em 100 mL de meio e mantendo-se a $36,5^\circ\text{C}$ sob agitação. Além disso, as condições nutricionais da cultura também foram consideradas, monitorando-se o nível de açúcar redutor presente no meio durante o mesmo período de tempo (Figura 3). Os resultados obtidos a partir da dosagem dos níveis de açúcar redutor (OD_{540}) foram aplicados à curva de calibração construída ($y = 0,2906x - 0,1481$; $R^2 = 0,9969$). Esses experimentos foram realizados em triplicata, sendo o erro padrão representado pela barra de erro da figura 3.

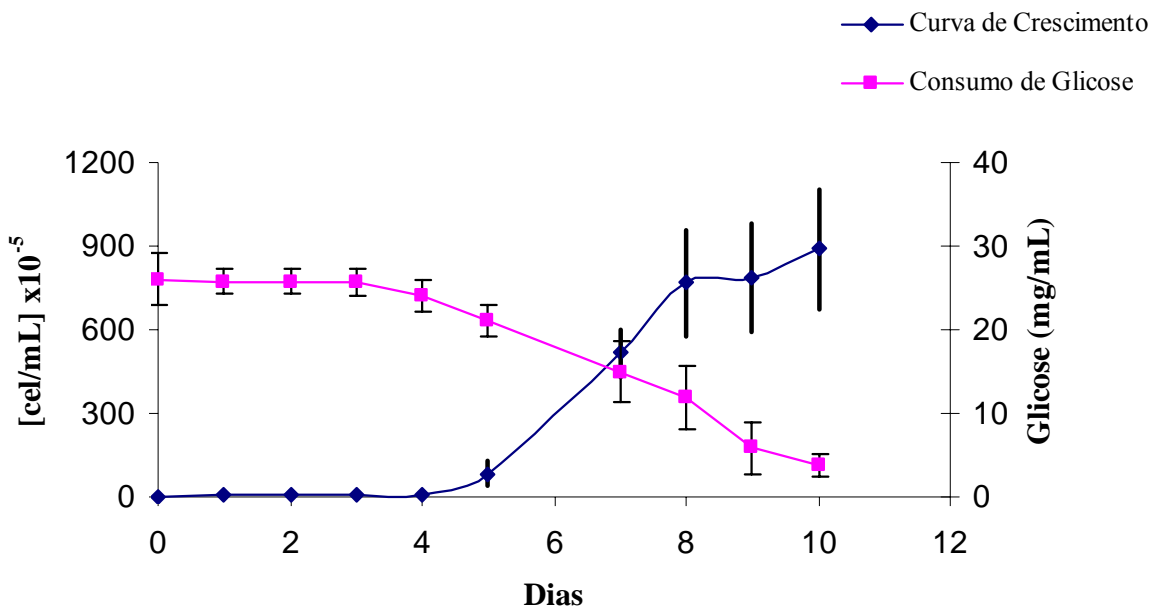


Figura 3. Curva de crescimento da forma de levedura do isolado *Pb01* de *P. brasiliensis* e monitoramento do consumo de glicose pelo fungo. Foram inoculadas $2,5 \times 10^7$ células de *P. brasiliensis* em 100 mL de meio YPD a $36,5^\circ\text{C}$ sob agitação (130 rpm). Nos intervalos de tempo indicados, alíquotas da cultura foram utilizadas para contagem de células viáveis e para a dosagem dos níveis de açúcar redutor presentes no meio.

Os resultados obtidos nesses experimentos permitiram a definição do tempo de cultivo do fungo em meio YPD, para utilização dessas células em experimentos cultivando-se *P. brasiliensis* em condições similares àquelas encontradas no fagossomo. O tempo estabelecido, no qual as células encontram-se na fase log e não foram ainda submetidas a condições de carência nutricional, foi de 6 dias de pré-cultivo (Figura 3).

2. Padronização das condições de amplificação dos genes a serem estudados

As condições de PCR a serem utilizadas foram padronizadas empregando-se como molde da reação o cDNA total ou o DNA genômico de *P. brasiliensis*. Utilizando-se como molde um quinto (1/5) da reação de transcrição reversa na qual foram utilizados cerca de 2

µg do RNA total extraído do fungo crescido em meio YPD, observou-se a amplificação de um fragmento de DNA de tamanho esperado (conforme descrito na tabela 3) para todos os genes analisados (Figura 4). Esses resultados indicam que as condições de amplificação utilizadas são adequadas para os estudos de análise de expressão gênica.

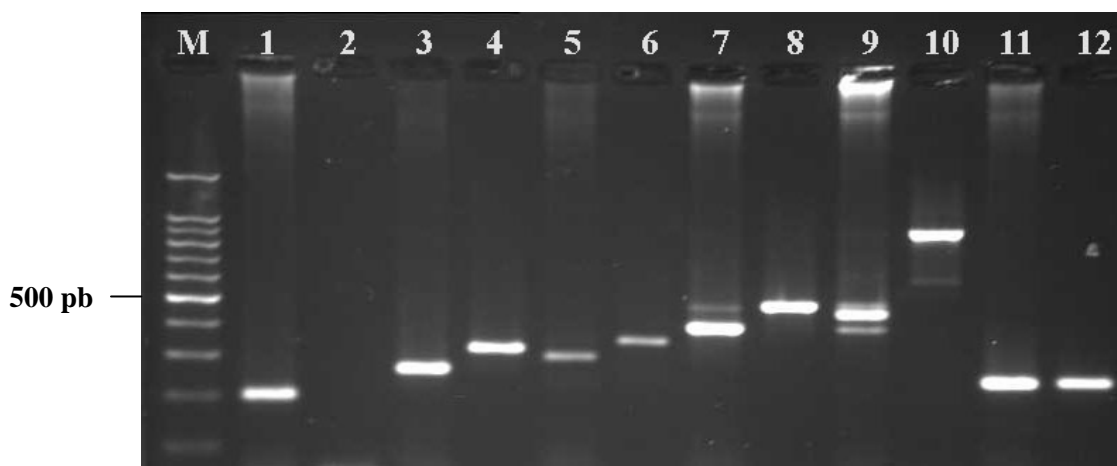


Figura 4. Padronização das condições de amplificação de potenciais genes de virulência utilizando-se como molde da PCR um quinto (1/5) da reação de transcrição reversa na qual foram utilizados cerca de 2 µg do RNA total extraído do fungo (números ímpares) ou 20 ng de DNA genômico (números pares) de *P. brasiliensis*. A análise da PCR foi feita por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. As condições da PCR foram padronizadas para os seguintes genes em estudo: *α-tub* (1 e 2), *icl1* (3 e 4), *icl2* (5 e 6), *mls1* (7 e 8), *ady2* (9 e 10) e *ure1* (11 e 12). M: Marcador de massa molecular (100 bp “DNA ladder”, Promega).

Quando foi utilizado cerca de 20 ng DNA genômico de *P. brasiliensis* como molde da reação, houve amplificação para todos os genes em estudo, exceto para o gene *α-tub* (Figura 4), que será empregado como controle interno nos experimentos futuros de análise quantitativa dos níveis de expressão gênica de potenciais fatores de virulência desse microrganismo. Além disso, esse experimento permitiu verificar a presença de íntrons na região flanqueada pelos iniciadores empregados para os genes *icl1*, *icl2*, *mls1* e *ady2*, como mostrado pela amplificação de um fragmento de DNA de tamanho maior que o esperado (Figura 4).

3. Estabelecimento da fase exponencial de amplificação

Para uma análise quantitativa dos níveis de expressão gênica pela técnica de RT-PCR, é importante selecionar o número apropriado de ciclos de amplificação, o qual deve corresponder à fase exponencial (fase log), não tendo sido alcançado o platô da reação, que impossibilita quantificações. A fase exponencial pode ser experimentalmente determinada a partir da clara visualização, em gel de agarose, do aumento da intensidade da banda correspondente ao produto de PCR avaliado à medida que o número de ciclos de amplificação é aumentado (Marone *et al.*, 2001). Nesse sentido, após padronização das condições de PCR, determinou-se o número de ciclos no qual a amplificação encontra-se na fase exponencial, o que permite uma análise quantitativa dos níveis de expressão gênica. Para todos os genes foram feitas PCRs variando-se o número de ciclos de amplificação (24, 27, 30, 33 e 36 ciclos). Utilizou-se como molde dessas reações 1/5 do produto da reação de transcrição reversa obtido a partir de 2 µg de RNA total de *P. brasiliensis* cultivado em meio YPD, sendo amplificado em todos os sistemas, além do gene de interesse, o gene α -*tub*, cuja expressão é constitutiva na fase de levedura de *P. brasiliensis*. Dessa forma, o número ótimo de ciclos deve ser o mesmo para o gene em estudo e o gene α -*tub*, que servirá como controle interno nos experimentos de RT-PCR semiquantitativa a serem realizados.

Na figura 5 são apresentados os resultados obtidos para os genes potencialmente relacionados à virulência de *P. brasiliensis* que serão objetos de estudo nesse trabalho. Os resultados obtidos apresentaram padrões similares para todos os genes. Nesse sentido, para as análises dos níveis de expressão desses potenciais fatores de virulência, foi estabelecido o número de 25 ciclos a ser utilizado nas reações de PCR semiquantitativas. Para todos os genes, verificou-se aumento na intensidade das bandas correspondentes à amplificação dos fragmentos de DNA de tamanhos esperados quando se aumentou o número de ciclos de 24 a 30, demonstrando que nessa faixa não foi atingido o platô da reação.

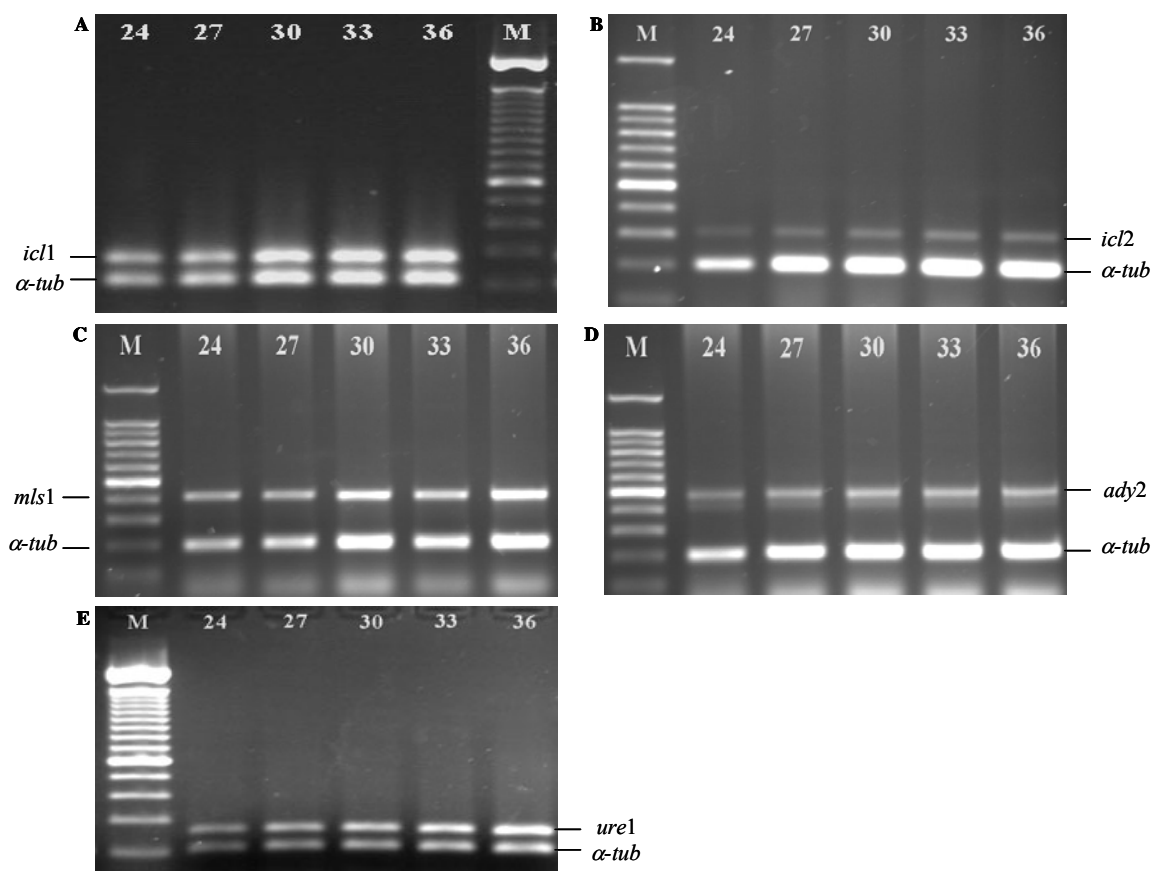


Figura 5. Determinação da faixa exponencial de amplificação para os potenciais genes de virulência de *P. brasiliensis* a serem estudados. As amplificações foram realizadas por 24, 27, 30, 33 e 36 ciclos. Os produtos de PCR correspondentes a 4/5 do volume da reação de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. O experimento foi feito para os genes *icl1* (A), *icl2* (B), *mls1* (C), *ady2* (D) e *ure1* (E). Em todos os casos, o fragmento de DNA inferior corresponde ao gene da α -tubulina (α -*tub*), empregado como controle interno. M: Marcador de massa molecular (100 pb “DNA Ladder”, Invitrogen -A e E- ou Promega -B, C e D – a banda mais intensa representa um fragmento de DNA de 500 pb).

4. Análise comparativa dos níveis de expressão dos genes *icl1*, *icl2*, *mls1* e *ady2* de *P. brasiliensis* cultivado, *in vitro*, em diferentes condições nutricionais

Os macrófagos apresentam-se como células de defesa centrais no combate a patógenos intracelulares. Ao serem fagocitados pelos macrófagos, os microrganismos são expostos a inúmeras moléculas antimicrobianas, como EROs e ERNs, além do fagossomo representar um ambiente de pH baixo e de ser nutricionalmente pobre. Essas condições de estresse exigem mecanismos que permitam a sobrevivência desses patógenos intracelulares, como resistência a moléculas microbicidas e adaptação ao ambiente existente no interior das células fagocitárias (Finlay & Falkow, 1997; Schnappinger *et al.*, 2003).

Dentre as adaptações necessárias a microrganismos capazes de persistir no interior de macrófagos, está a habilidade de assimilar fontes de carbono como ácidos graxos e produtos da degradação lipídica, disponíveis nesse ambiente (Schnappinger *et al.*, 2003; Muñoz-Eliás & McKinney, 2005). Uma das vias metabólicas requeridas por muitos microrganismos para utilização dessas fontes de carbono é o ciclo do glioxalato, que possibilita a produção de energia a partir de compostos de dois carbonos (Finlay & Falkow, 1997; Muñoz-Eliás & McKinney, 2005). Nas seqüências promotoras dos genes *icl1* e *mls1* de *S. cerevisiae*, que codificam, respectivamente, as enzimas chaves do ciclo do glioxalato isocitrato liase e malato sintase, foram identificados elementos responsivos à fonte de carbono (CSRE), cuja repressão foi observada em presença de glicose (Schöler & Schüller, 1994; Caspary *et al.*, 1997). Adicionalmente, Rude *et al.* (2002) verificaram que a expressão do gene *icl1* é induzida quando *C. neoformans* é cultivado em meio contendo como única fonte de carbono acetato ou etanol, ou ainda em meios com baixa disponibilidade de glicose. Nesse contexto, para análise da expressão dos genes *icl1* e *mls1* do isolado *Pb01* de *P. brasiliensis*, na forma de levedura, o fungo foi submetido à condição de carência nutricional, tendo acetato como única fonte de carbono. Esses experimentos tiveram como objetivo mimetizar um possível estresse que ocorre no interior de células fagocitárias.

Nesse sentido, depois de crescido em meio YPD por 6 dias como estabelecido previamente (Figura 3), o fungo foi cultivado por diferentes tempos (0,5 h, 1 h e 5 h) em meio MVM-acetato e em meio MVM-glicose (controle). Os experimentos foram realizados

em triplicata, sendo sempre verificada, após o período determinado de cultivo, a morfologia e a viabilidade das células de *P. brasiliensis*. Em todos os experimentos, o número de células viáveis manteve-se constante em uma faixa de 90-95 %, não sendo observadas diferenças entre as leveduras de *P. brasiliensis* cultivadas em meio contendo glicose ou acetato como única fonte de carbono. Na figura 6 é possível verificar que após 5 horas de cultivo em meio MVM-acetato, as células leveduriformes de *P. brasiliensis* não apresentaram alterações morfológicas, e a ocorrência de células mortas (células coradas em azul) foi baixa. Resultados similares foram obtidos para as células cultivadas em meio MVM-glicose (dados não mostrados).



Figura 6. Análise da viabilidade de células leveduriformes de *P. brasiliensis* após cultivo por 5 horas em meio contendo acetato como única fonte de carbono. As células foram coradas com o corante Verde-Janus e visualizadas por microscopia ótica em aumento de 40 vezes. As leveduras não apresentaram alterações morfológicas e o índice de células inviáveis (células coradas em azul) foi de aproximadamente 5 %, como também observado para o controle no qual o fungo foi crescido em presença de glicose (dados não mostrados).

Adicionalmente, os níveis de açúcar redutor presentes no meio após cultivo do fungo foram dosados. No meio MVM-acetado, em todos os experimentos, não foi verificada presença de açúcar redutor, como esperado. Já no meio MVM-glicose, os níveis

de açúcar redutor mantiveram-se praticamente constantes após cultivo do fungo nos diferentes períodos de tempo, observando-se uma pequena queda de aproximadamente 0,1 % da quantidade de glicose presente no meio após 5 h de cultivo.

As células de *P. brasiliensis* recuperadas após cada ensaio tiveram ainda seu RNA total extraído (item 10 da metodologia), quantificado por espectrofotometria e analisado por eletroforese em gel de agarose 1% em condições livres de RNAses, sendo observado um perfil eletroforético compatível ao de uma preparação de RNAs intactos (Figura 7).

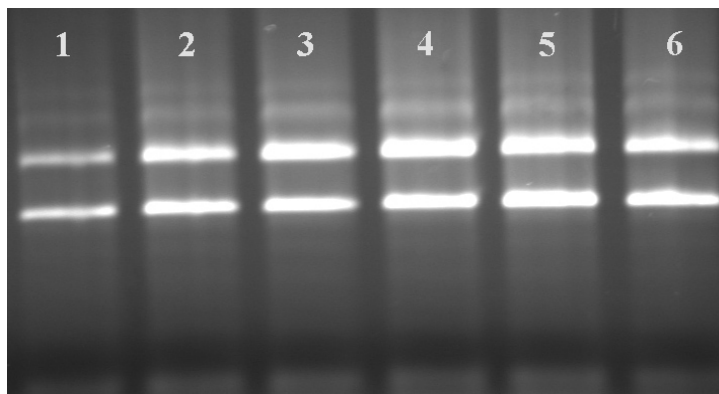


Figura 7. Perfil eletroforético do RNA total extraído do fungo *P. brasiliensis* cultivado em meio MVM-glicose ou meio MVM-acetato. Uma alíquota correspondente a aproximadamente 2 µg de RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, em condições livres de RNase. Poços 1, 3 e 5: RNA total de *P. brasiliensis* cultivado em meio MVM-glicose (2 % de glicose) por 0,5 h, 1 h e 5 h, respectivamente. Poços 2, 4 e 6: RNA total de *P. brasiliensis* cultivado em meio MVM-acetato (2 % de acetato de sódio) por 0,5 h, 1 h e 5 h, respectivamente.

Após tratamento com DNase I livre de RNase para eliminar possível contaminação com DNA genômico, o RNA total foi precipitado com etanol, e novamente quantificado e analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando-se intacto (Figura 8).

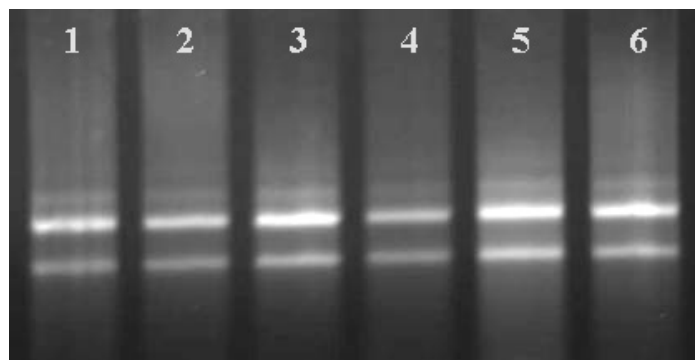


Figura 8. Perfil eletroforético do RNA total do fungo *P. brasiliensis* após tratamento com DNase I livre de RNases. Uma alíquota correspondente a aproximadamente 1 µg de RNA total tratado com DNase I foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, em condições livres de RNase. Poços 1, 3 e 5: RNA total de *P. brasiliensis* cultivado em meio MVM-glicose (2 % de glicose) por 0,5 h, 1 h e 5 h, respectivamente. Poços 2, 4 e 6: RNA total de *P. brasiliensis* cultivado em meio MVM-acetato (2 % de acetato de sódio) por 0,5 h, 1 h e 5 h, respectivamente.

Posteriormente, uma alíquota de 2 µg do RNA total tratado com DNase I foi utilizada em uma reação de transcrição reversa, conforme descrito no item 12.1 da metodologia. Um quinto do produto dessa reação foi posteriormente utilizado em uma PCR semiquantitativa visando analisar os níveis de expressão dos genes *icl1*, *icl2*, *mls1* e *ady2* após cultivo do fungo em condição de estresse nutricional, comparando-se aos níveis de expressão obtidos em condição controle do experimento. O controle interno constitutivo empregado foi o gene da α -tubulina (*α -tub*), sendo utilizado como base comparativa para quantificação dos níveis de expressão dos genes de interesse. Resultados obtidos para os genes *icl1*, *icl2*, *mls1* e *ady2*, a partir de RT-PCR semiquantitativa, estão mostrados na figura 9 (A, B, C e D, respectivamente).

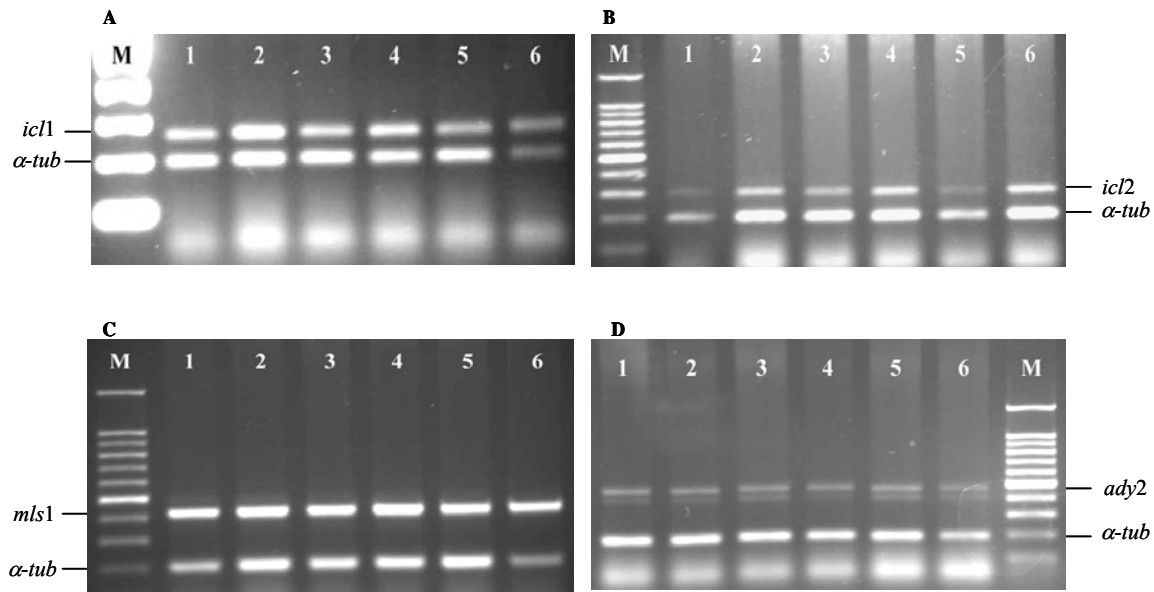


Figura 9. Análise comparativa da expressão dos genes *icl1* (A), *icl2* (B), *mls1* (C) e *ady2* (D) de *P. brasiliensis* quando do cultivo do fungo por diferentes intervalos de tempo em meio contendo 2 % de glicose (MVM-glicose) ou 2 % de acetato de sódio (MVM-acetato) como única fonte de carbono. A verificação dos níveis de expressão gênica foi feita em triplicata por meio de RT-PCR semiquantitativa. A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 2 μ g de RNA total isolado de *P. brasiliensis*, após cultivo nas diferentes condições. Uma alíquota correspondendo a 1/5 da reação de síntese de cDNA (5 μ L), foi empregada como molde para amplificação, em uma mesma reação, de um fragmento do gene de interesse (*icl1*, *icl2*, *mls1* ou *ady2*) e do gene constitutivo α -*tub*. Para todos os experimentos, o fragmento de DNA inferior representa a porção amplificada do gene α -*tub*, empregado como controle interno da reação. Vinte μ L da PCR foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. Poços 1, 3 e 5: RT-PCR feita a partir do RNA total de *P. brasiliensis* cultivado em meio MVM-glicose por 0,5 h, 1 h e 5 h, respectivamente. Poços 2, 4 e 6: RT-PCR feita a partir do RNA total de *P. brasiliensis* cultivado em meio MVM-acetato por 0,5 h, 1 h e 5 h, respectivamente. M: Marcador de massa molecular 100 “base pair DNA ladder”, Invitrogen (A) ou Promega (B, C e D) – a banda mais intensa representa um fragmento de DNA de 500 pb.

Para quantificação dos resultados, utilizou-se o programa “Scion Image”, procedendo-se conforme especificado no item 14 da metodologia. A partir dos valores obtidos por densitometria referentes aos fragmentos de DNA amplificados (Figura 9), as razões entre os níveis de expressão dos potenciais genes de virulência (*icl1*, *icl2*, *mls1* ou *ady2*) e do gene constitutivo α -*tub* foram determinadas, quando do cultivo do fungo em meio MVM-acetato e em meio MVM-glicose, por três diferentes tempos (0,5 h; 1 h; e 5 h). Esses resultados estão mostrados nas figuras 10 (*icl1* e *icl2*) e 11 (*mls1* e *ady2*).

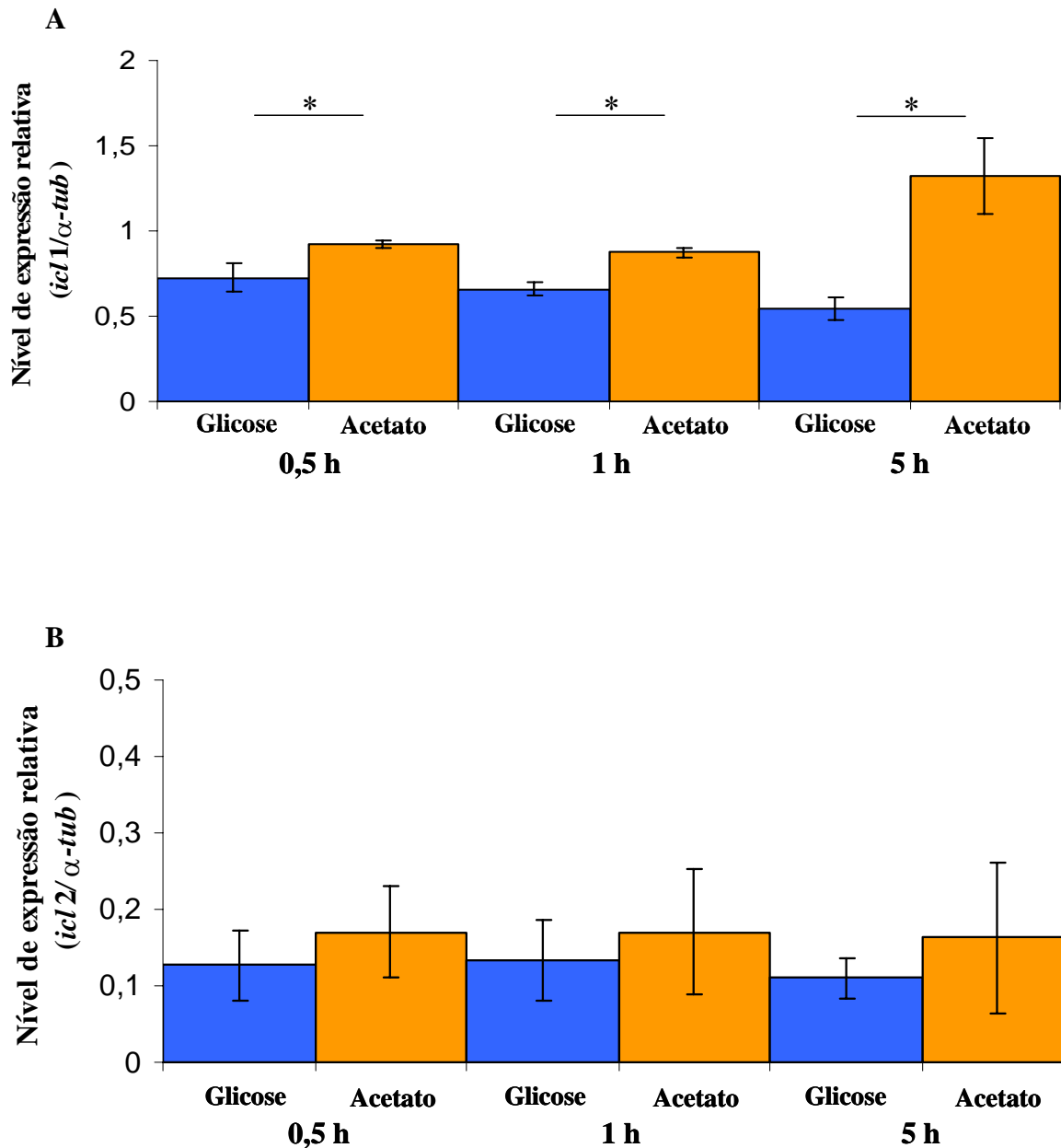


Figura 10. Análise semiquantitativa dos níveis de expressão dos genes *icl1* (A) e *icl2* (B) de *P. brasiliensis* feita utilizando-se ferramentas do programa “Scion Image”. Os resultados referentes aos níveis de expressão dos genes *icl1* (Figura 9A) e *icl2* (Figura 9B) foram quantificados por densitometria empregando-se o programa “Scion Image” (<http://www.scioncorp.com>). Os gráficos A e B mostram, respectivamente, a média das razões entre o nível de expressão dos genes *icl1* e *icl2* de *P. brasiliensis*, e o controle interno α -*tub*. As barras de erro representam o erro padrão dos experimentos. As análises estatísticas dos resultados obtidos por densitometria foram feitas utilizando-se o programa de computador “Mynova”, versão 1.3 (S. Brooks, Copyright 1993). O teste aplicado foi o teste-t de Student. * $p < 0,05$.

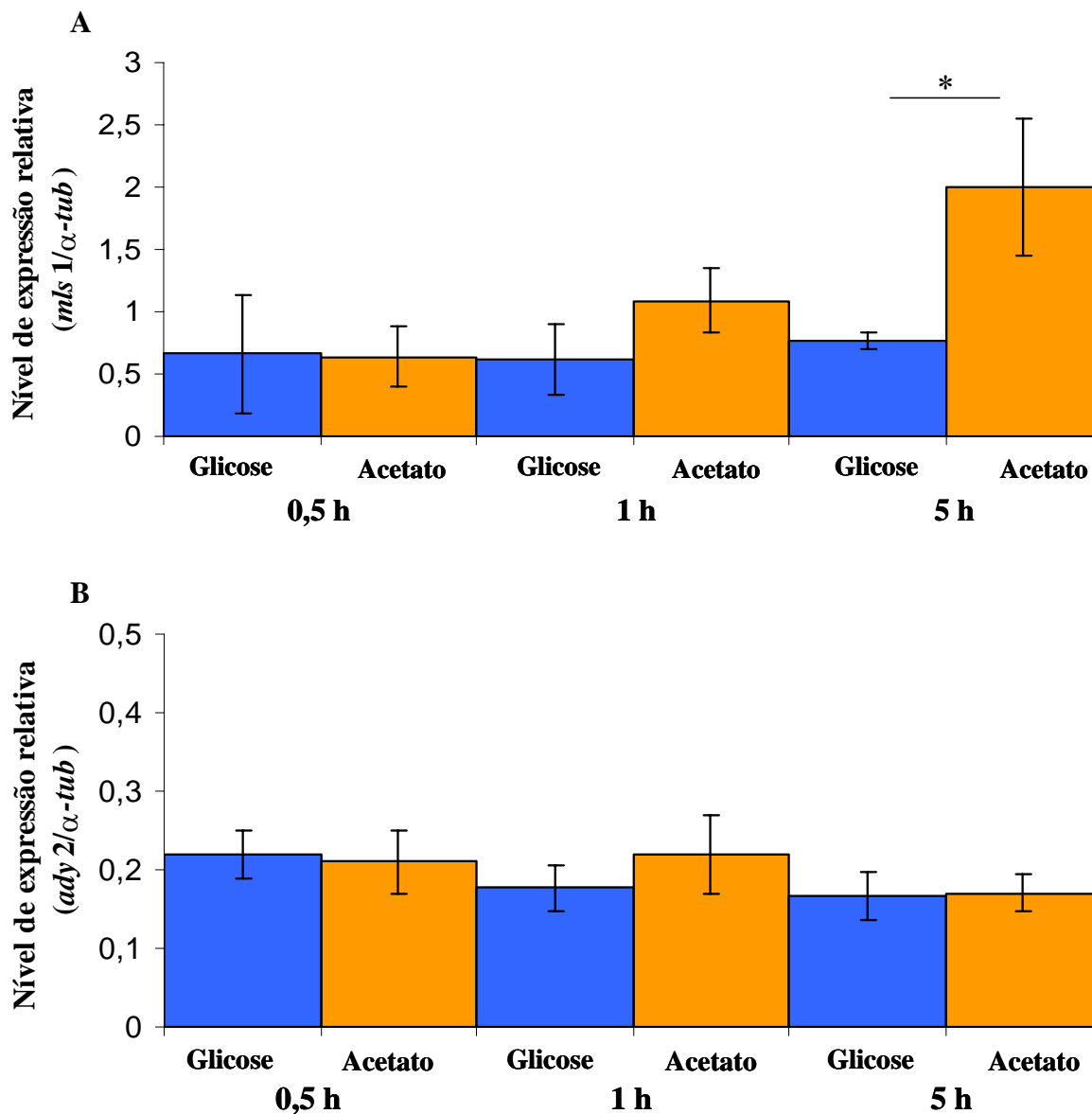


Figura 11. Análise semiquantitativa dos níveis de expressão dos genes *mls1* (A) e *ady2* (B) de *P. brasiliensis* feita utilizando-se ferramentas do programa “Scion Image”. Os resultados referentes aos níveis de expressão dos genes *mls1* (Figura 9C) e *ady2* (Figura 9D) foram quantificados por densitometria empregando-se o programa “Scion Image” (<http://www.scioncorp.com>). Os gráficos A e B mostram, respectivamente, a média das razões entre o nível de expressão dos genes *mls1* e *ady2* de *P. brasiliensis*, e o controle interno α -*tub*. As barras de erro representam o erro padrão dos experimentos. As análises estatísticas dos resultados obtidos por densitometria foram feitas utilizando-se o programa de computador “Mynova”, versão 1.3 (S. Brooks, Copyright 1993). O teste aplicado foi o teste-t de Student. * $p < 0,05$.

Como mostrado na figura 10A, verifica-se um significativo aumento nos níveis de expressão do gene *icl1* de *P. brasiliensis* quando do cultivo do fungo em ausência de fontes complexas de carbono (meio MVM-acetato), comparando-se aos correspondentes controles cultivados em presença de glicose (meio MVM-glicose). Esses resultados sugerem que a expressão do gene *icl1* de *P. brasiliensis* é dependente da fonte primária de carbono, sendo corroborados por dados da literatura obtidos para outros organismos.

De acordo com resultados obtidos em experimentos de “Northern blot”, Rude *et al.* (2002) verificaram um significativo aumento nos níveis de expressão do gene *icl1* de *C. neoformans* cultivado em presença de acetato, além da não detecção do transcrito em presença de glicose. Em contrapartida, os resultados desse trabalho mostram um nível basal de expressão do gene *icl1* de *P. brasiliensis* mesmo quando do cultivo do fungo em meio contendo glicose como única fonte de carbono (Figuras 9A e 10A). É importante ressaltar que a metodologia empregada para análise de expressão de genes nesse trabalho (RT-PCR semiquantitativa) apresenta uma maior sensibilidade quando comparada à metodologia de “Northern blot”, o que poderia explicar os diferentes resultados obtidos por ambos os grupos. Além disso, Felipe *et al.* (2005) também mostraram a detecção do transcrito *icl1* de células leveduriformes de *P. brasiliensis* cultivadas em condição padrão, contendo glicose como fonte de carbono. Embora esses dados corroborem os resultados aqui observados, vale ressaltar que os níveis de açúcar redutor presentes no meio, após crescimento do fungo por 7 dias, não foram monitorados, podendo-se especular uma possível submissão do fungo à condição de estresse nutricional, resultando no grande acúmulo verificado para o transcrito *icl1*, conforme detectado nos experimentos de “Northern blot”.

Adicionalmente, Bentrup *et al.* (1999) verificaram uma diminuição nos níveis protéicos de ICL1, bem como na atividade dessa enzima de *Mycobacterium avium* e *M. tuberculosis*, quando essas bactérias foram cultivadas em presença de glicose, comparando-se ao cultivo em acetato. O aumento na atividade enzimática de ICL1 nessas condições também foi verificada para *Candida lipolytica* (Matsuoka *et al.*, 1980). Esses e os demais dados aqui apresentados sugerem que a regulação do gene *icl1* pode ocorrer em nível transcricional, pós-transcricional, traducional e/ou pós-traducional.

A existência de dois genes que codificam a enzima isocitrato liase (*icl1* e *icl2*) em *Mycobacterium tuberculosis* foi recentemente descrita por Muños-Elías & McKinney (2005). Os mesmos autores verificaram que apenas o duplo mutante para os genes *icl1* e *icl2* é incapaz crescer em meio contendo unicamente acetato como fonte de carbono. Além disso, o duplo mutante reconstituído com um dos genes que codificam para ICL em *M. tuberculosis* teve sua capacidade de utilizar acetato como fonte de energia restaurada, sugerindo um papel redundante dessas duas enzimas (Muños-Elías & McKinney, 2005). Entretanto, conforme mostrado na figura 10, o possível gene *icl2* de *P. brasiliensis* apresenta diferente padrão de expressão quando comparado ao gene que codifica a outra isoforma. Em oposição aos resultados obtidos para *icl1*, para o gene *icl2* parece não haver alteração nos níveis de seu respectivo mRNA em resposta ao cultivo do fungo em meio MVM-acetato, comparando-se ao cultivo em meio MVM-glicose (Figura 10B).

Resultados obtidos por meio de análises computacionais, pelo aluno Luciano Procópio (dissertação de mestrado, em preparação), demonstraram que as seqüências parciais de resíduos de aminoácidos dos genes *icl1* e *icl2* de *P. brasiliensis* são significativamente diferentes, apesar da identificação de domínios característicos da enzima isocitrato liase em ambas as seqüências. Análises adicionais utilizando-se a ferramenta BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) mostraram que os referidos genes apresentam similaridade com seqüências correspondentes a proteínas com atividade isocitrato liase de outros microrganismos. Entretanto, por meio dessas análises é possível verificar uma grande identidade entre a seqüência de resíduos de aminoácidos relacionada à ICL2 de *P. brasiliensis* e seqüências correspondentes à enzima 2-metil-isocitrato liase de outros fungos (resultados obtidos pelo aluno Luciano Procópio). Com base nesses dados, sugere-se que o gene *icl2* de *P. brasiliensis* possa codificar a enzima 2-metil isocitrato liase, importante no ciclo do metilcitrato. A grande similaridade entre a seqüência de resíduos de aminoácidos das enzimas isocitrato liase e 2-metil isocitrato liase de *S. cerevisiae*, codificadas respectivamente pelos genes *icl1* e *icl2*, levou à suposição inicial de que ICL2 tratava-se de uma proteína não funcional, já que a introdução de múltiplas cópias de *icl2* ao mutante $\Delta icl1$ não restaurava a capacidade da levedura em produzir energia a partir de

compostos de dois carbonos (Heinisch *et al.*, 1996). Estudos posteriores mostraram que o gene *icl2* de *S. cerevisiae* codifica a enzima 2-metil isocitrato liase (Luttik *et al.*, 2000).

O ciclo do metilcitrato permite a utilização de propionato como fonte de carbono para produção de energia. Recentemente, Brock (2005) mostrou que mutantes de *Aspergillus nidulans* para o gene *mcsA*, que codifica a enzima 2-metil-isocitrato liase, não crescem a partir de propionato como única fonte de carbono. Adicionalmente, o mesmo grupo não observou diferenças na taxa de crescimento de isolados mutantes para esse gene comparando-se ao tipo selvagem, quando do cultivo do fungo em meio contendo acetato ou glicose (Brock & Buckel, 2004), sugerindo que a regulação do gene *mcsA* de *Aspergillus nidulans* não é diretamente alterada por essas fontes de carbono. Esses dados corroboram a hipótese de que o gene *icl2* de *P. brasiliensis* possa codificar a enzima 2-metil-isocitrato liase, já que os níveis do referido mRNA mostraram-se muito semelhantes quando o fungo foi cultivado em presença de glicose ou acetato (Figura 10B). Em adição à completa caracterização desse gene, experimentos empregando-se propionato como fonte única de carbono podem ser realizados para validar essa hipótese.

Assim como verificado para o gene *icl1* de *P. brasiliensis* (Figura 10A), os níveis de expressão do gene *mls1*, que codifica a enzima malato sintase, apresentaram aumento quando a única fonte de carbono disponível ao fungo foi o acetato (Figura 11A). Esse aumento foi significativamente mais expressivo após 5 h de cultivo do fungo em meio MVM-acetato (Figura 11A). A indução da expressão do gene *mls1* foi também verificada em *Neurospora crassa* quando o fungo foi transferido de um meio contendo fontes complexas de carbono para um meio com acetato como fonte única de energia (Thomas *et al.*, 1988). Ainda, o gene que codifica a enzima MLS1 de *Aspergillus nidulans* foi transcricionalmente induzido por acetato, como verificado por Sandeman & Hynes (1989).

Os resultados obtidos nesse trabalho para o fungo *P. brasiliensis* sugerem uma clara regulação das enzimas chaves do ciclo do glioxalato, ICL1 e MLS1, dependente de fonte de carbono. Como pode ser observado nas figuras 10A e 11A, ambos os genes apresentam níveis basais de expressão quando o fungo é cultivado em presença de glicose, havendo um

aumento no acúmulo de seus respectivos mRNAs quando *P. brasiliensis* é submetido a um ambiente carente em fontes complexas de carbono (MVM-acetato).

Outro gene de *P. brasiliensis* analisado quanto à expressão em diferentes fontes de carbono foi o *ady2*, homólogo ao gene *gpr1* de *Y. lipolytica*. Trabalhos recentes vêm levantando o papel da proteína GPR1 na adaptação desse ascomiceto em presença de acetato. Augstein *et al.* (2003), em experimentos no qual o promotor GPR1 foi fusionado ao gene repórter *lacZ*, demonstraram que a expressão de β -galactosidase foi aumentada três vezes quando do cultivo de *Y. lipolytica* em acetato ou etanol como única fonte de carbono, comparando-se ao cultivo do fungo em glicose. Esses resultados indicam que a transcrição do gene *gpr1* é alterada em resposta a fontes de carbono. Em contraste, para *P. brasiliensis* não foram observadas diferenças nos níveis do mRNA *ady2* cultivando-se o fungo em meio MVM-glicose ou MVM-acetato, indicando que, provavelmente, outros fatores sejam necessários para a regulação da expressão desse gene (Figura 11B).

Alguns autores sugerem também que a regulação da proteína GPR1 de *Y. lipolytica* é pH-dependente, estando envolvida na adaptação do fungo em presença de acetato quando o pH do meio encontra-se ácido (Tzschope *et al.*, 1999; Gentsch & Barth, 2005). Embora não tenha sido avaliada, nesse trabalho, a regulação em níveis protéicos, é possível que outros fatores, como variações de pH, possam também influenciar no acúmulo de mRNA do gene em questão. Nesse sentido, é importante ressaltar que para todos os experimentos, o meio de cultivo do fungo *P. brasiliensis* foi ajustado a um pH neutro.

5. Detecção da atividade da enzima urease de *P. brasiliensis*

Dentre os genes identificados no transcriptoma de *P. brasiliensis* está o ortólogo ao gene que codifica a enzima urease de outros microrganismos. Essa enzima foi descrita como fator de virulência de fungos patogênicos como *C. neoformans* e *Coccidioides posadasii* (Cox *et al.*, 2000; Mirbod-Donovan *et al.*, 2006). Dessa forma, um possível papel da enzima urease de *P. brasiliensis* como fator de virulência poderia ser especulado.

Primeiramente, com o intuito de verificar a atividade da enzima urease de *P. brasiliensis*, ensaio enzimático em placa contendo meio Ágar Base Uréia foi realizado conforme descrito no item 4 da metodologia. Após 3 horas de incubação a 37°C foi possível verificar a formação de um halo de cor vermelho-púrpura ao redor das células fúngicas, decorrente da alcalinização do meio pela atividade ureásica (Figura 12).

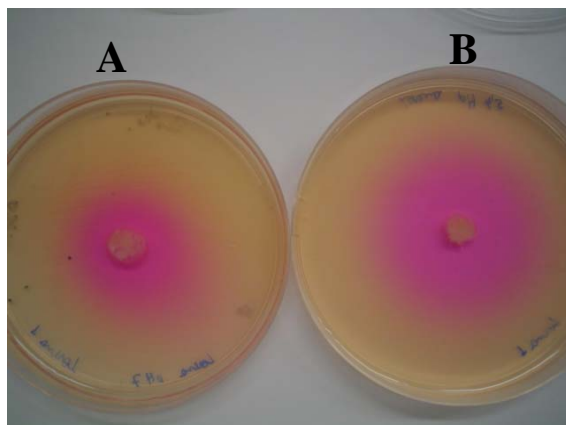


Figura 12. Teste de atividade da enzima urease de *P. brasiliensis*. Cerca de 50 mg de leveduras foram inoculadas em meio Ágar Base Uréia e incubadas a 37°C por 3 e 5 h (A e B, respectivamente), sendo possível verificar atividade da enzima urease pela formação de um halo de cor vermelho-púrpura.

Ao ser inoculado o fungo em meio desprovido de uréia, a formação do halo não foi observada, sugerindo que a reação alcalina produzida deve-se de fato à atividade da enzima urease de *P. brasileinsis* (dados não mostrados). Os resultados obtidos nesses experimentos indicam que a enzima urease do isolado *Pb01* de *P. brasiliensis* é funcionalmente ativa.

6. Análise comparativa dos níveis de expressão do gene *ure1* de *P. brasiliensis* cultivado, *in vitro*, em diferentes pHs

A atividade da enzima urease de alguns microrganismos é parcialmente responsável pela alcalinização do micro-ambiente externo devido à formação de amônia como produto da reação (Mirbod-Donovan *et al.*, 2006). A sobrevivência da bactéria *H. pylori* no micro-ambiente gastro-intestinal, por exemplo, é estritamente dependente da elevação do pH do meio, mediada pela atividade da enzima urease desse microrganismo. Nesse contexto, Akada *et al.* (2000) mostraram que o nível de expressão do gene *ure1* de *H. pylori* é dependente de pH, sendo aumentado em ambientes ácidos, de modo a promover uma alcalinização do meio e permitir a colonização dessa bactéria na mucosa gastro-intestinal.

Uma vez que o fungo *P. brasiliensis* apresenta-se como um patógeno intracelular facultativo, capaz de sobreviver e se replicar no interior de macrófagos, é razoável especular um papel da enzima urease na adaptação desse microrganismo ao ambiente ácido do fagossomo. Nesse sentido, visando a analisar uma possível regulação do gene *ure1* dependente de pH, o isolado *Pb01* de *P. brasiliensis* foi submetido a diferentes condições de cultivo com variação do pH do meio.

Para tanto, depois de crescido em meio YPD por 6 dias como estabelecido (Figura 3), o fungo foi cultivado por diferentes tempos (0,5 h, 1 h, 5 h e 18h) em pH neutro (7.0) ou em pH ácido (4.5). Em todos os experimentos verificou-se, após o período determinado de cultivo, morfologia e viabilidades das células de *P. brasiliensis*, não sendo observadas alterações (dados não mostrados). Adicionalmente, após cultivo do fungo, o pH exógeno do meio foi medido (tabela 4), sendo todos os experimentos realizados em triplicata.

Os valores listados na tabela 4 sugerem uma queda do pH inicialmente neutro com o passar do tempo de cultivo do fungo, decorrente provavelmente de produtos metabólicos lançados ao meio. Em contrapartida, verifica-se que, após 18 h de cultivo de *P. brasiliensis* partindo-se de um pH ácido, há uma alcalinização do meio externo (tabela 4). Esses dados

sugerem a existência de mecanismos regulados por esse microrganismo para a manutenção de um pH levemente ácido.

Tabela 4. Determinação do pH do meio exógeno após cultivo do fungo *P. brasiliensis* por diferentes períodos de tempo (0,5 h; 1 h; 5 h; 18 h) em pH neutro (7.0) ou em pH ácido (4.5).

Meio de Cultura (pH inicial)	Tempo de cultivo do fungo <i>P. brasiliensis</i>			
	0,5 h	1 h	5 h	18 h
pH 7.0	pH 6,7 +/- 0,0	pH 6,5 +/- 0,1	pH 6,3 +/- 0,2	pH 5,6 +/- 0,4
pH 4.5	pH 4,3 +/- 0,0	pH 4,3 +/- 0,1	pH 4,5 +/- 0,3	pH 5,0 +/- 0,6

As células de *P. brasiliensis* recuperadas após cada experimento tiveram seu RNA total extraído (item 10 da metodologia), quantificado por espectofotometria e analisado por eletroforese em gel de agarose 1% em condições livres de RNAses (dados não mostrados). Posteriormente, 10 µg do RNA total foi submetido a tratamento com DNase I livre de RNase, precipitado com etanol, e novamente analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, apresentando-se intacto (dados não mostrados). Sequencialmente, uma alíquota desse RNA foi utilizada em uma reação de transcrição reversa, conforme descrito no item 12.1 da metodologia. Visando avaliar os níveis de expressão do gene *ure1* em diferentes pHs, um quinto do produto dessa reação foi utilizado em uma PCR semiquantitativa. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A figura 13 mostra o resultado obtido para o gene *ure1* a partir de um dos experimentos de RT-PCR semiquantitativa.

Para quantificação dos resultados obtidos utilizou-se o programa “Scion Image”, procedendo-se conforme especificado no item 14 da metodologia. As razões entre os níveis de expressão do gene *ure1* e do gene constitutivo *α-tub*, quando do cultivo do fungo em pH neutro (7.0) e em pH ácido (4.5), por diferentes intervalos de tempo (0,5 h; 1 h; 5 h; 18 h), estão representadas na figura 14.

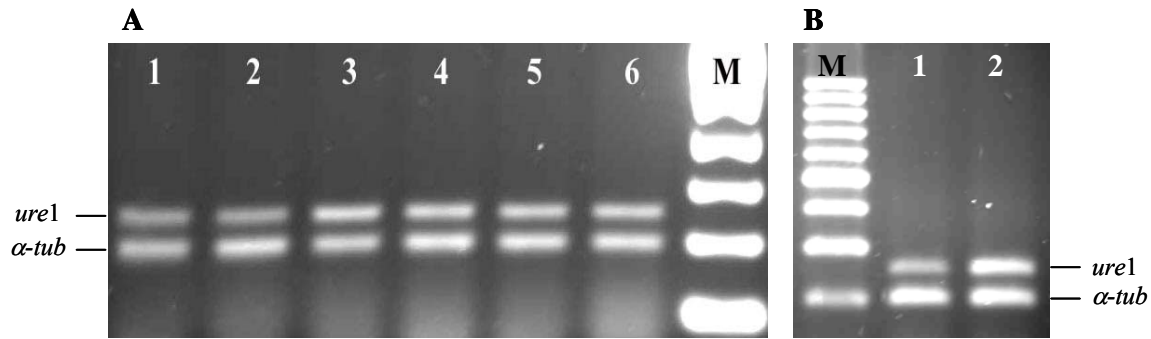


Figura 13. Análise comparativa da expressão do gene *ure1* de *P. brasiliensis* quando do cultivo do fungo em pH neutro ou em pH ácido por diferentes intervalos de tempo, pela metodologia de RT-PCR semiquantitativa. A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 2 μ g de RNA total isolado de *P. brasiliensis* após cultivo desse microrganismo em diferentes pHs. Uma alíquota correspondendo a 1/5 da reação de síntese de cDNA foi empregada como molde para amplificação, em uma mesma reação, de um fragmento do gene *ure1* e um fragmento de DNA referente ao gene constitutivo *α -tub* (fragmento de DNA inferior), empregado como controle interno da reação. Vinte μ L da PCR foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. (A) Poços 1, 3 e 5: RT-PCR semiquantitativa feita a partir do RNA total de *P. brasiliensis* cultivado em pH 7.0 por 0,5 h, 1 h e 5 h, respectivamente. Poços 2, 4 e 6: RT-PCR feita a partir do RNA total de *P. brasiliensis* cultivado em pH 4.5 por 0,5 h, 1 h e 5 h, respectivamente. (B) Poços 1 e 2: RT-PCR feita a partir do RNA total de *P. brasiliensis* cultivado por 18 h em pH 7.0 ou em pH 4.5, respectivamente. M: Marcador de massa molecular 100 “base pair DNA ladder”, Promega (A) ou Invitrogen (B).

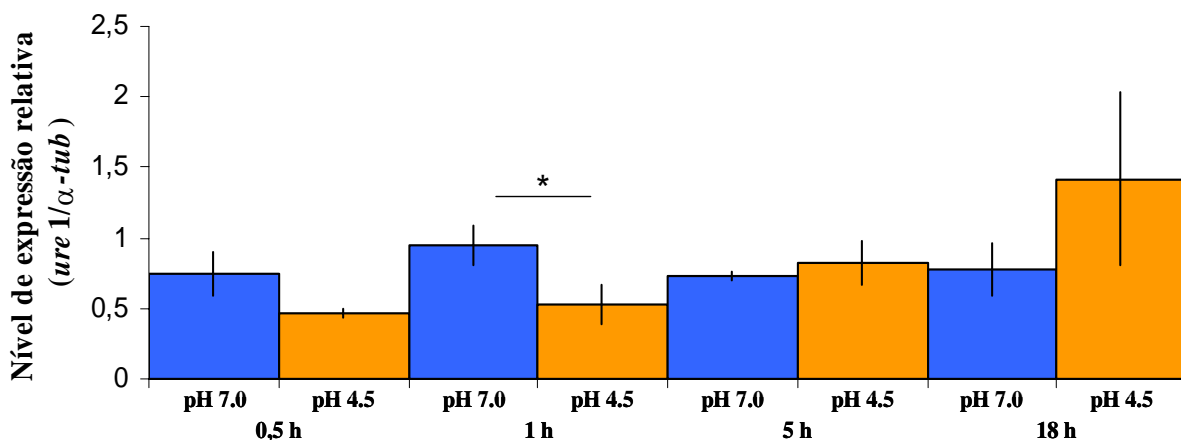


Figura 14. Análise semiquantitativa dos níveis de expressão do gene *ure1* feita utilizando-se ferramentas do programa “Scion Image”. Os resultados referentes aos níveis de expressão do gene *ure1* (figura 13) foram quantificados por densitometria empregando-se o programa “Scion Image” (<http://www.scioncorp.com>). O gráfico mostra a média das razões entre o nível de expressão do gene *ure1* de *P. brasiliensis* e o controle interno *α -tub*. As barras de erro representam o erro padrão dos experimentos. As análises estatísticas dos resultados foram feitas utilizando-se o programa de computador “Mynova”, versão 1.3 (S. Brooks, Copyright 1993). O teste aplicado foi o teste-t de Student. *p<0,05.

Apesar de não terem sido verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de expressão do gene *ure1* quando do cultivo de *P. brasiliensis* em pH 4.5 e em pH 7.0 por diferentes períodos de tempo, os resultados obtidos indicam uma tendência de aumento nos níveis do mRNA referente ao gene *ure1* após cultivo prolongado do fungo em pH ácido (Figura 14). Variando-se o tempo de cultivo de *P. brasiliensis* em pH neutro não foram observadas grandes alterações na quantidade de mRNA que codifica a enzima urease desse microrganismo, como pode ser observado na figura 14.

A regulação da expressão do gene *ure1* de outros fungos por pH não é descrita na literatura. O que se observa é uma regulação da enzima urease dependente de fontes de nitrogênio, como verificado para *A. nidulans* (Mackay & Pateman, 1982). Dessa forma, a ação do pH na expressão do gene que codifica a enzima urease desses microrganismos ainda é incerta. Os resultados desse trabalho para *P. brasiliensis* sugerem que o gene *ure1* não apresenta regulação imediata por pH. Entretanto, os níveis do mRNA *ure1* após períodos mais prolongados de cultivo desse fungo em ambiente ácido devem ser analisados para obtenção de dados mais precisos.

7. Análise da expressão de genes relacionados ao ciclo do glioxalato do fungo *P. brasiliensis* recuperado de macrófagos peritoniais de camundongo

Recentemente, muitos autores vêm relatando o papel das enzimas do ciclo do glioxalato de bactérias e fungos patogênicos na virulência dos microrganismos e nos mecanismos de interação patógeno-hospedeiro. Lorenz & Fink (2001), em experimentos de “Northern blot” utilizando-se RNA de leveduras de *S. cerevisiae* e *C. albicans* crescidas na presença de macrófagos, mostraram que os genes que codificam as enzimas chaves do ciclo do glioxalato (*icl1* e *mls1*) de ambos os organismos eram significativamente induzidos, comparando-se à expressão desses genes na ausência de macrófagos. Resultados similares foram obtidos para *M. tuberculosis*, verificando-se um aumento da expressão do gene *icl* em resposta ao evento de fagocitose (Schnappinger *et al.*, 2003). Esses dados indicam que a

ativação do ciclo do glioxalato é importante na adaptação de patógenos intracelulares ao ambiente encontrado no interior do fagossomo de células hospedeiras.

Nesse contexto, para verificação dos níveis de expressão dos genes *icl1* e *mls1* de *P. brasiliensis* em presença de células fagocitárias, utilizou-se, em experimentos de RT-PCR semiquantitativa, mRNA do fungo obtido a partir de 6 horas de co-cultura com macrófagos peritoneais de camundongo. A população de mRNA aqui utilizada foi previamente amplificada (MessageAmp™ aRNA Kit - Ambion), e gentilmente cedida pelos alunos de doutorado Aldo Tavares e Simoneide Silva (tese em andamento). Em todos os experimentos de RT-PCR, o gene α -*tub* foi empregado como controle interno nas reações de amplificação, sendo utilizado como base comparativa para quantificação dos níveis de expressão dos genes de interesse. Resultados obtidos a partir de RT-PCR semiquantitativa para os genes *icl1* e *mls1* estão mostrados na figura 15A e 15B, respectivamente.

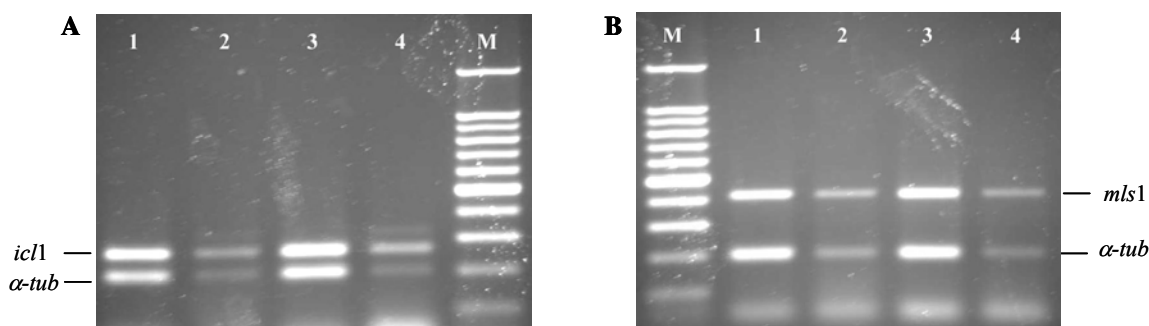


Figura 15. Análise comparativa da expressão dos genes *icl1* (A) e *mls1* (B) de *P. brasiliensis* quando do co-cultivo do fungo com macrófagos peritoneais de camundongo por 6 h, por meio de RT-PCR semiquantitativa. A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de cerca de 300 ng de mRNA do fungo obtido da co-cultura de leveduras de *P. brasiliensis* e macrófagos peritoneais de camundongo (linhagem Balb/C) por 6 h. Como controle dos experimentos, foi utilizado RNA de *P. brasiliensis* cultivado *in vitro* em meio Fava-Neto por 7 dias. Uma alíquota correspondendo a 1/5 da reação de síntese de cDNA (5 μ L), foi empregada como molde para amplificação, em uma mesma reação, de um fragmento do gene de interesse (*icl1* e *mls1*) e do gene constitutivo α -*tub* (fragmento de DNA inferior). Vinte μ L da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. As reações de amplificação foram feitas em duplicata. Poços 1 e 3: RT-PCR feita a partir do mRNA de *P. brasiliensis* cultivado em meio Fava-Neto por 7 dias. Poços 2 e 4: RT-PCR feita a partir do mRNA de *P. brasiliensis* mantido em co-cultura com macrófagos peritoneais de camundongo por 6 h. M: Marcador de massa molecular 100 “base pair DNA ladder” (Promega) - a banda mais intensa representa um fragmento de DNA de 500 pb.

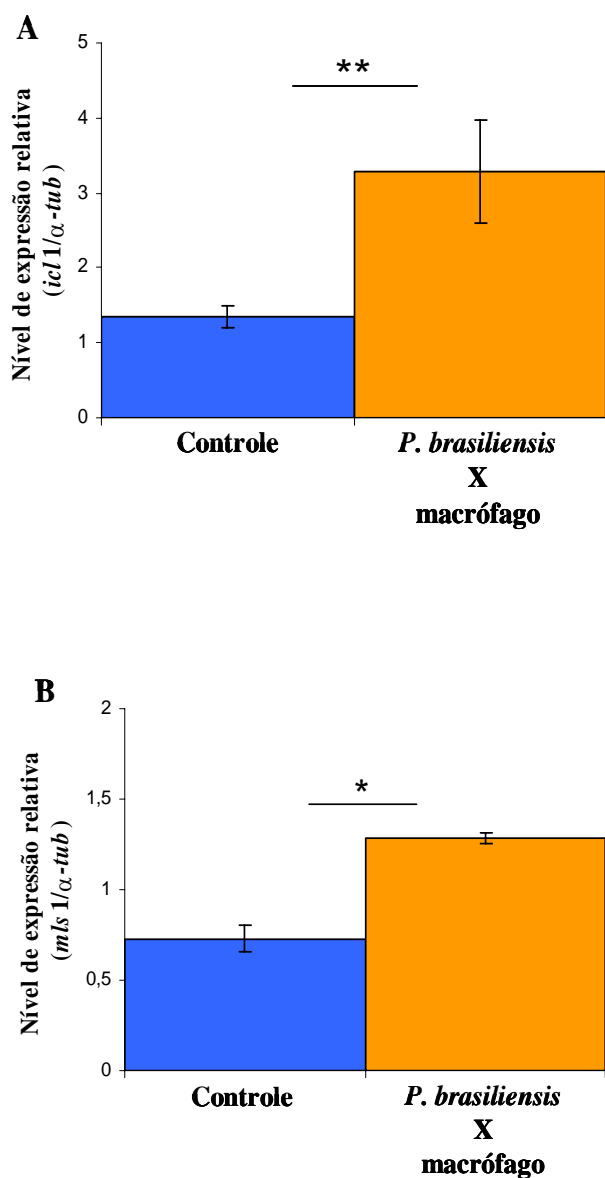


Figura 16. Análise semiquantitativa dos níveis de expressão dos genes *icl1* (A) e *mls1* (B) do fungo *P. brasiliensis* feita utilizando-se ferramentas do programa “Scion Image”. Os resultados referentes aos níveis de expressão dos genes *icl1* (Figura 15A) e *mls1* (Figura 15B) foram quantificados por densitometria empregando-se o programa “Scion Image” (<http://www.scioncorp.com>). O gene da α - tubulina (α -*tub*) foi empregado como controle interno das reações. Os gráficos A e B mostram, respectivamente, a média das razões entre o nível de expressão dos genes *icl1* e *mls1* de *P. brasiliensis*, e o controle interno α -*tub*. As barras de erro representam o erro padrão dos experimentos. As análises estatísticas dos resultados obtidos por densitometria foram feitas utilizando-se o programa de computador “Mynova”, versão 1.3 (S. Brooks, Copyright 1993). O teste aplicado foi o teste-t de Student. * $p < 0,05$. ** $p < 0,1$.

Para quantificação dos resultados utilizou-se o programa “Scion Image”, procedendo-se conforme especificado no item 14 da metodologia. A partir dos valores obtidos por densitometria referentes aos fragmentos de DNA amplificados (Figura 15), as razões entre os níveis de expressão dos potenciais genes de virulência (*icl1* ou *mls1*) e do gene constitutivo *α -tub* foram determinadas, quando do co-cultivo do fungo por 6 h em presença de macrófagos peritoniais de camundongos, e em condição controle, cultivado por 7 dias em meio Fava-Neto (Figura 16). É importante ressaltar que, embora os experimentos de RT-PCR tenham sido feitos em duplicada para cada gene estudado, a população de mRNA utilizada representa uma série de repetições biológicas do experimento, o que aumenta a confiabilidade dos resultados apresentados nesse trabalho.

Como mostrado na figura 16, verifica-se um aumento nos níveis de expressão dos genes *icl1* e *mls1* de *P. brasiliensis* submetido à co-cultura com células de macrófagos, comparando-se aos níveis de expressão dos mesmos genes quando do cultivo padrão das leveduras em meio acelular. Esses resultados são similares aos encontrados para outros microrganismos (Graham *et al.*, 1999; Lorenz & Fink, 2001; Schnappinger *et al.*, 2003), sugerindo uma indução da expressão dos genes do ciclo do glioxalato após a fagocitose das células de *P. brasiliensis* por macrófagos. Embora as análises feitas indiquem um aumento mais significativo na expressão do gene *mls1* ($p < 0,05$) do que o observado para o gene *icl1* ($p < 0,1$) de *P. brasiliensis*, não é possível fazer uma correlação direta entre a significância estatística e a real significância biológica desses resultados, sendo provavelmente necessário um maior número de repetições experimentais. Além disso, a fraca intensidade das bandas correspondentes aos fragmentos de DNA amplificados dos genes em estudo, quando do co-cultivo levedura-macrófago (Figura 15), dificulta as análises quantitativas por densitometria.

O aumento nos níveis de expressão dos genes que codificam as enzimas chaves do ciclo do glioxalato de *P. brasiliensis* em resposta ao evento de fagocitose apresenta-se como um possível mecanismo de adaptação do fungo ao ambiente hostil do fagossomo. Como demonstrado anteriormente, a regulação da expressão dos genes *icl1* e *mls1* de *P. brasiliensis* é dependente do estado nutricional do fungo, já que esses genes são induzidos

em ambientes carentes em fontes complexas de carbono (Figuras 10A e 11A). Nesse sentido, a ativação do ciclo do glioxalato após a fagocitose das células de *P. brasiliensis* indica um mecanismo adaptativo que permite ao fungo sobreviver no interior do fagossomo, onde o ambiente é nutricionalmente pobre em fontes complexas de carbono, possibilitando a produção de energia a partir de compostos de dois carbonos.

A seguir, a mesma metodologia foi empregada para análise da expressão do ortólogo ao gene *ady2* de *S. cerevisiae*, identificado no transcriptoma de *P. brasiliensis*. Esse gene parece codificar uma permease de acetato, estando potencialmente relacionado à captação de moléculas de dois carbonos. Os resultados obtidos para o possível gene *ady2* de *P. brasiliensis* a partir da técnica de RT-PCR utilizando-se RNA isolado do fungo após infecção de macrófagos peritoniais de camundongos, e a correspondente análise da expressão gênica, estão apresentados nas figuras 17 e 18, respectivamente.

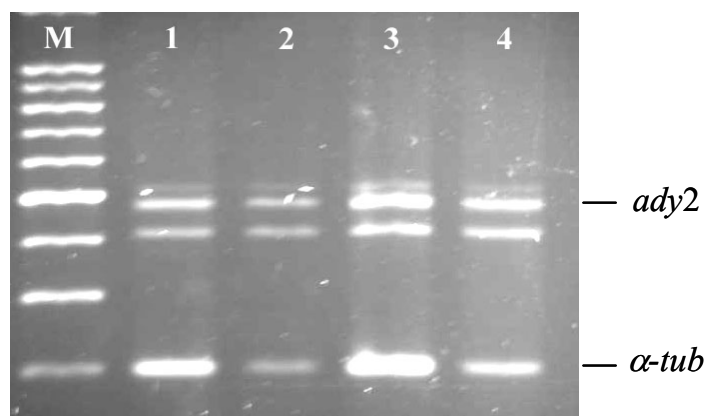


Figura 17. Análise comparativa da expressão do gene *ady2* de *P. brasiliensis* quando do cultivo do fungo em co-cultura com macrófagos peritoniais de camundongo por 6 h, empregando-se a metodologia de RT-PCR semiquantitativa. Esse experimento foi realizado exatamente como descrito na legenda da figura 15. Poços 1 e 3: RT-PCR feita a partir do mRNA de *P. brasiliensis* cultivado em meio Fava-Neto por 7 dias. Poços 2 e 4: RT-PCR feita a partir do mRNA de *P. brasiliensis* mantido em co-cultura com macrófagos peritoniais de camundongo por 6 h. M: Marcador de massa molecular 100 “base pair DNA ladder” (Promega) - a banda mais intensa representa um fragmento de DNA de 500 pb.

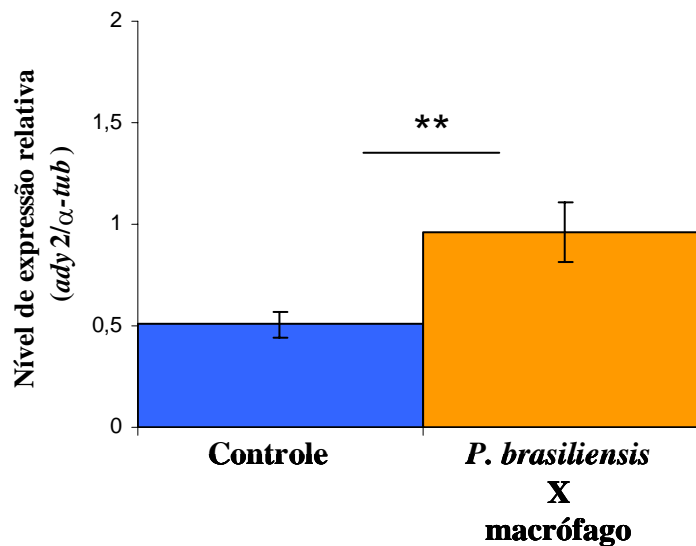


Figura 18. Análise semiquantitativa dos níveis de expressão do provável gene *ady2* do fungo *P. brasiliensis* feita utilizando-se ferramentas do programa “Scion Image” (<http://www.scioncorp.com>). O fungo *P. brasiliensis* foi mantido em co-cultura com macrófagos peritoniais de camundongo por 6 h (barras laranja), e em condição controle cultivado *in vitro* em meio Fava-Neto (barras azuis). O RNA extraído após cultivo do fungo nessas condições foi utilizado em experimentos de RT-PCR semiquantitativa, realizados em duplicata. O gene da α -tubulina (α -*tub*) foi empregado como controle interno das reações. O gráfico mostra a média das razões entre o nível de expressão do gene *ady2* de *P. brasiliensis*, e o controle interno α -*tub*. As barras de erro representam o erro padrão dos experimentos. As análises estatísticas dos resultados foram feitas utilizando-se o programa de computador “Mynova”, versão 1.3 (S. Brooks, Copyright 1993). O teste aplicado foi o teste-t de Student. ** $p < 0,1$.

Embora mais de um produto tenha sido observado no experimento de RT-PCR mostrado anteriormente (Figura 17), a quantificação por densitometria foi feita considerando-se apenas o fragmento de DNA de tamanho esperado para a correspondente região amplificada do gene *ady2*. Análises mais precisas, empregando-se a ferramenta BLASTn, para comparação das seqüências dos iniciadores utilizados nesse experimento, com as seqüências depositadas no banco de PbAESTs do Projeto Transcriptoma de *P. brasiliensis*, mostraram pareamento da porção 3’OH desses oligonucleotídeos em outras seqüências de nucleotídeos que não correspondem ao gene *ady2*. Esses dados poderiam explicar a amplificação de mais de um produto, como foi verificado. Nesse sentido, julga-se necessário o seqüenciamento do produto amplificado que foi utilizado como base para as

análises quantitativas desse trabalho, visando à confirmação de que esse fragmento de DNA corresponde ao gene *ady2* de *P. brasiliensis*.

Em experimentos anteriores de microarranjo de DNA conduzidos pelos alunos Aldo Tavares e Simoneide Silva (tese de doutorado em andamento), foi verificado um aumento significativo na expressão do gene *ady2* de *P. brasiliensis* empregando como sonda a mesma população de mRNA utilizada nos experimentos de RT-PCR descritos acima (Figuras 15 e 17). Nesse trabalho também foi verificado aumento nos níveis de mRNA *ady2* quando do co-cultivo de leveduras e macrófagos, sugerindo que esse gene desempenhe um papel na adaptação do fungo ao ambiente encontrado no interior das células fagocitárias (Figura 18). As análises estatísticas dos resultados obtidos pela metodologia de RT-PCR mostram, entretanto, uma significância de 90 % ($p < 0,1$), indicando que esses experimentos devem ser repetidos para confirmação final desses dados.

A regulação da expressão do gene *ady2* de *P. brasiliensis* em condições experimentais de cultivo *in vitro* parece ocorrer independente das fontes de carbono disponíveis, como mostrado na figura 11B. Entretanto, o ambiente proposto para o fagossomo, além da carência de carboidratos, apresenta outros aspectos, como baixo pH. Como discutido anteriormente, a regulação dos níveis da proteína GPR1 de *Y. lipolytica*, homóloga a ADY2, apresenta-se dependente da fonte de carbono unicamente quando o pH do meio é ácido (Tzschope *et al.*, 1999; Gentsch & Barth, 2005). Embora o presente estudo tenha sido feito com base nos níveis de mRNA, é possível que o gene *ady2* de *P. brasiliensis* seja regulado em resposta a um conjunto de fatores verificados no interior do fagossomo, representando uma adaptação do fungo a esse ambiente. Nessas condições, o aumento dos níveis de expressão do gene *ady2* permitiria uma maior captação de acetato, produto da oxidação lipídica, disponível no interior de macrófagos. Experimentos empregando-se diferentes fontes de carbono em conjunto com outras variáveis, como modificação do pH do meio, podem ser realizados para verificar os níveis de mRNA *ady2* nessas diferentes condições.

Principais Resultados

1. Os resultados obtidos nesse trabalho mostram um significativo aumento nos níveis de expressão dos genes *icl1* e *mls1* de *P. brasiliensis*, que codificam as enzimas chaves do ciclo do glioxalato, isocitrato liase e malato sintase, respectivamente, quando do cultivo do fungo em ausência de fontes complexas de carbono. Além disso, foi verificado que ambos os genes apresentam níveis basais de expressão quando o fungo é cultivado em presença de glicose.
2. Os níveis de expressão dos genes *icl1* e *mls1* de *P. brasiliensis* apresentaram aumento quando o fungo foi submetido à co-cultura com células de macrófagos peritoneais de camundongo, comparando-se aos níveis de expressão dos mesmos genes quando do cultivo padrão das leveduras em meio acelular. Esses resultados indicam um possível mecanismo de adaptação do fungo ao ambiente hostil encontrado no interior de macrófagos.
3. O nível de expressão do gene *icl2* de *P. brasiliensis* parece não sofrer alteração em resposta ao cultivo do fungo em meio contendo acetato ou glicose como única fonte de carbono.
4. Não foram observadas diferenças nos níveis do mRNA *ady2* de *P. brasiliensis*, que possivelmente codifica uma permease de acetato, quando o fungo foi cultivado, *in vitro*, em presença de glicose ou acetato como única fonte de carbono disponível, indicando que, provavelmente, outros fatores sejam necessários para a regulação da expressão desse gene.
5. Os níveis de mRNA *ady2* foram aumentados quando do co-cultivo de leveduras e macrófagos peritoneais de camundongo, sugerindo que esse gene desempenhe um papel adaptativo que possivelmente permita uma maior captação de acetato, produto da oxidação lipídica, disponível no interior de macrófagos.

6. Por meio de ensaio de atividade enzimática, demonstrou-se que, na condição de cultivo utilizada, a enzima urease do isolado *Pb01* do fungo *P. brasiliensis* é funcionalmente ativa.

7. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de expressão do gene *ure1*, que codifica a enzima urease, quando do cultivo de *P. brasiliensis* em pH 4.5 e em pH 7.0 por diferentes períodos de tempo. Entretanto, os resultados obtidos indicam uma tendência de aumento nos níveis do mRNA referente ao gene *ure1* após cultivo prolongado do fungo em pH ácido.

Perspectivas

1. Utilização de outras fontes de carbono alternativas que possivelmente mimetizem uma condição nutricional encontrada no interior de macrófagos, como o palmitato, importante substrato do processo de β -oxidação, para análise dos níveis de expressão dos genes *icl1* e *mls1*.
2. Análise dos níveis de expressão do gene *icl2* de *P. brasiliensis* empregando-se propionato como fonte única de carbono visando avaliar a hipótese de que esse gene codifique a enzima 2-metil isocitrato liase.
3. Verificação dos níveis de mRNA *ady2* quando do cultivo, *in vitro*, do fungo *P. brasiliensis* em diferentes condições, variando-se, simultaneamente, a fonte de carbono e o pH do meio, por exemplo.
4. Seqüenciamento do fragmento de DNA de tamanho correspondente ao esperado para o gene *ady2* de *P. brasiliensis*, que foi utilizado como base para as análises quantitativas desse trabalho, visando à validação dos resultados obtidos.
5. Análise dos níveis do mRNA *ure1* após períodos mais prolongados de cultivo do fungo *P. brasiliensis* em ambiente ácido, tendo como objetivo a obtenção de dados mais precisos sobre a regulação desse gene em resposta ao pH do meio.
6. Repetição dos experimentos de RT-PCR utilizando-se RNA de *P. brasiliensis* mantido após diferentes tempos de co-cultura com macrófagos peritoniais de camundongo.

Referências Bibliográficas

- Akada, J.K., Shirai, M., Takeuchi, H., Tsuda, M., Nakazawa, T.** (2000) Identification of the urease operon in *Helicobacter pylori* and its control by mRNA decay in response to pH. *Mol Microbiol.* Jun; 36(5):1071-84.
- Akhter, S., McDade, H.C., Gorlach, J.M., Heinrich, G., Cox, G.M., Perfect, J.R.** (2003) Role of alternative oxidase gene in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 71: 5794-5802.
- Arruda, C., Franco, M.F., Kashino, S.S., Nascimento, F.R., Fazioli, R.dos A., Vaz, C.A., Russo, M., Calich, V.L.** (2002) Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. *Clin. Immunol.* 103: 185-195.
- Augstein, A., Barth, K., Gentsch, M., Kohlwein, S.D., Barth G.** (2003) Characterization, localization and functional analysis of Gpr1p, a protein affecting sensitivity to acetic acid in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology.* Mar; 149(Pt 3):589-600.
- Babior, B.M.** (2000) Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.* 109: 33-44.
- Bagagli, E., Sano, A., Coelho, K.I., Alquati, S., Miyaji, M., de Camargo, Z.P., Gomes, G.M., Franco, M., Montenegro, M.R.** (1998) Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Apr; 58(4):505-12.
- Basu, M., Czinn, S.J., Blanchard, T.G.** (2004) Absence of catalase reduces long-term survival of *Helicobacter pylori* in macrophage phagosomes. *Helicobacter.* 9: 211-216.
- Benard, G., Romano, C.C., Cacere, C.R., Juvenale, M., Mendes-Giannini, M.J., Duarte, A.J.** (2001) Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* Feb 21; 13(4):248-52.
- Bentrup, K.H.Z., Miczak, A., Swenson, D.L., Russell, D.G.** (1999) Characterization of activity and expression of isocitrate lyase in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.* Dec;181(23):7161-7.
- Bocca, A. L., Hayashi, E. E., Pinheiro, A. G., Furlanetto, A. B., Campanelli, A. P., Cunha, F. Q., Figueiredo, F.** (1998) Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. *J. Immun.*, 161: 3056-3063.

- Borges-Walmsley, M.I., Chen, D., Shu, X., Walmsley, A.R.** (2002) The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol.* Feb;10(2):80-7. Review.
- Brock, M. & Buckel, W.** (2004) On the mechanism of action of the antifungal agent propionate. *Eur J Biochem.* Aug; 271(15):3227-41.
- Brock, M.** (2005) Generation and phenotypic characterization of *Aspergillus nidulans* methylisocitrate lyase deletion mutants: methylisocitrate inhibits growth and conidiation. *Appl Environ Microbiol.* Sep; 71(9):5465-75.
- Brummer, E., Hanson, L.H, Stevens, D.A.** (1988) Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. *Int. J. Immunopharmacol.* 10: 945-52.
- Brummer, E., Hanson, L.H., Restrepo, A., Stevens, D.A.** (1989) Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect. Immun.* 57: 2289-2294.
- Brummer, E., Castaneda, E., Restrepo, A.** (1993) Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev.* Apr; 6(2):89-117. Review.
- Bulawa, C.E., Miller, D.W., Henry, L.K., Becker, J.M.** (1995) Attenuated virulence of chitin-deficient mutants of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Nov 7; 92(23):10570-4.
- Calich, V.L., Singer-Vermes, L.M., Siqueira, A.M., Burger, E.** (1985) Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br. J. Exp. Pathol.* Oct; 66(5):585-94.
- Calich, V.L. & Kashino, S.S.** (1998) Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.* May; 31(5):615-23.
- Camargo, Z.P. & Franco, M.F.** (2000) Current Knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of Paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol.* 17: 41-48.
- Cano, L.E., Kashino, S.S., Arruda, C., André, D., Xidieh, C.F., Singer-Vermes, L.M., Vaz, C.A., Burger, E., Calich, V.L.** (1998) Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* 66: 800-806.
- Casadevall, A., Steenbergen, J.N., Nosanchuk, J.D.** (2003) 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi – the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Cur. Op. Microbiology.* 6:332-337.
- Caspary, F., Hartig, A., Schüller, H.J.** (1997) Constitutive and carbon source-responsive promoter elements are involved in the regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* malate synthase gene MLS1. *Mol Gen Genet.* Aug; 255(6):619-27.

- Coutinho, Z.F., da Silva, D., Lazéra, M., Petri, V., de Oliveira, R.M., Sabroza, P.C., Wanke, B.** (2002) Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 18:1441-1454.
- Cox, G.M., Mukherjee, J., Cole, G.T., Casadevall, A., Perfect, J.R.** (2000) Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect. Immun.* 68: 443-448.
- Cox, G.M., McDade, H.C., Chen, S.C., Tucker, S.C., Gottfredsson, M., Wright, L.C., Sorrell, T.C., Leidich, S.D., Casadevall, A., Ghannoum, M.A., Perfect, J.R.** (2001) Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 39: 166-175.
- Cox, G.M., Harrison, T.S., McDade, H.C., Taborda, C.P., Heinrich, G., Casadevall, A., Perfect, J.R.** (2003) Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infect Immun.* 71: 173-180.
- de Brito, T. & Franco, M.F.** (1994) Granulomatous inflammation. *Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo.* Mar-Apr; 36(2):185-92.
- Eaton, K.A., Krakowka, S.** (1994) Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* Sep; 62(9):3604-7.
- Falkow, S.** (1988) Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev. Infect. Dis. Suppl 2:* S274-276.
- Falkow, S.** (2004) Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity-a personal recollection 15 years later. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 67-72.
- Felipe, M.S., Andrade, R.V., Petrofeza, S.S., Maranhao, A.Q., Torres, F.A., Albuquerque, P., Arraes, F.B., Arruda, M., Azevedo, M.O., Baptista, A.J., Bataus, L.A., Borges, C.L., Campos, E.G., Cruz, M.R., Daher, B.S., Dantas, A., Ferreira, M.A., Ghil, G.V., Jesuino, R.S., Kyaw, C.M., Leitao, L., Martins, C.R., Moraes, L.M., Neves, E.O., Nicola, A.M., Alves, E.S., Parente, J.A., Pereira, M., Poças-Fonseca, M.J., Resende, R., Ribeiro, B.M., Saldanha, R.R., Santos, S.C., Silva-Pereira, I., Silva, M.A., Silveira, E., Simoes, I.C., Soares, R.B, Souza, D.P., De-Souza, M.T., Andrade, E.V., Xavier, M.A., Veiga, H.P., Venancio, E.J., Carvalho, M.J., Oliveira, A.G., Inoue, M.K., Almeida, N.F., Walter, M.E., Soares, C.M., Brigido, M.M.** (2003) Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast.* 20: 263-271.
- Felipe, M.S., Andrade, R.V., Arraes, F.B., Nicola, A.M., Maranhão, A.Q., Torres, F., Silva-Pereira, I., Pocas-Fonseca, M.J., Campos, E.G., Moraes, L.M.P., Albuquerque, P., Tavares, A.H.F.P., Silva, S.S., Kyaw, C.M., Souza, D.P., PbGenome Network, Pereira, M., Jesuino, R.S.A., Andrade, E.V., Parente, J.A., Oliveira, G.S., Barbosa, M.S., Martins, N.F., Fachin, A.L., Cardoso, R.S., Passos, G.A.S., Almeida, N.F., Walter, M.E.M.T., Soares, C.M.A., Carvalho, M.J.,**

- Brigido, M.M.** (2005) Transcriptional Profiles of the Human Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in Mycelium and Yeast Cells. *J. Biol. Chem.* 280: 24706–24714.
- Figueiredo, F., Alves, L.M., Silva, C.L.** (1993) Tumour necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. *Clin Exp Immunol.* Aug; 93(2):189-94.
- Finlay, B.B. & Falkow, S.** (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 136-69.
- Fornari, M.C., Bava, A.J., Guerenzo, M.T., Berardi, V.E., Silaf, M.R., Negroni, R., Diez, R.A.** (2001) High serum interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha levels in chronic paracoccidioidomycosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* Sep; 8(5):1036-8.
- Franco, M.** (1987) Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol.* Feb; 25(1):5-18. Review.
- Franco, M., Peracoli, M.T., Soares, A., Montenegro, R., Mendes, R.P., Meira, D.A.** (1993) Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr. Top. Med. Mycol.;* 5:115-49.
- Franco, M., Lacaz, C.S., Restrepo, A., Del Negro, G.** (1994) Paracoccidioidomycosis. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Fridovich, I.** (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97-112.
- Gentsch, M. & Barth, G.** (2005) Carbon source dependent phosphorylation of the Gpr1 protein in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.* Jul; 5(10):909-17.
- Goihman-Yahr, M., Pine, L., Albornoz, M.C., Yarzabal, L., de Gomez, M.H., San Martin, B., Ocanto, A., Molina, T., Convit, J.** (1980) Studies on plating efficiency and estimation of viability of suspensions of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Mycopathologia.* Jul 1; 71(2):73-83.
- Goldman, G. H., Marques, E. R., Ribeiro, D. C. D., Bernardes, L. A. S., Quiapin, A. C., Vitorelli, P. M., Savoldi, M., Semighini, C. P., Oliveira, R. C., Nunes, L. R., Travassos, L. R., Puccia, R., Batista, W. L., Ferreira, L. E., Moreira, J. C., Bogossian, A. P., Tekaiia, F., Nobrega, M. P., Nobrega, F. G., Goldman, M. H. S.** (2003) Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukar. Cell*, 2:34–48.

- Gow, N.A., Brown, A.J., Odds, F.C.** (2002) Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol.* Aug;5(4):366-71. Review.
- Graham, J.E. & Clark-Curtiss, J.E.** (1999) Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96: 11554-11559.
- Hallak, J., San-Blas, F., San-Blas, G.** (1982) Isolation and wall analysis of dimorphic mutants of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia.* Mar; 20(1):51-62.
- Heinisch, J.J., Valdes, E., Alvarez, J., Rodicio, R.** (1996) Molecular genetics of ICL2, encoding a non-functional isocitrate lyase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* Oct; 12(13):1285-95.
- Huh, W.K. & Kang, S.O.** (1999) Molecular cloning and functional expression of alternative oxidase from *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 181: 4098-4102.
- Huh, W.K. & Kang, S.O.** (2001) Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. *Biochem. J.* 356: 595-604.
- Hwang, C.S., Rhie, G.E., Oh, J.H., Huh, W.K., Yim, H.S., Kang, S.O.** (2002) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology.* 148: 3705-3713.
- Ibrahim, A.S., Mirbod, F., Filler, S.G., Banno, Y., Cole, G.T., Kitajima, Y., Edwards, J.E. Jr, Nozawa, Y., Ghannoum, M.A.** (1995) Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 63: 1993-1998.
- Johnson, C.H., Prigge, J.T., Warren, A.D., McEwen, J.E.** (2003) Characterization of an alternative oxidase activity of *Histoplasma capsulatum*. *Yeast.* 20: 381-388.
- Kanetsuna, F., Carbonell, L.M., Moreno, R.E., Rodriguez, J.** (1969) Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol.* Mar; 97(3):1036-41.
- Kanetsuna, F. & Carbonell, L.M.** (1970) Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol.* Mar; 101(3):675-80.
- Kashino, S. S., Fazioli, R. A., Cafalli-Favati, C., Meloni-Bruneri, L. H., Vaz, C. A. A., Burger, E., Singer, L. M., Calich, V. L. G.** (2000) Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN- γ production. *J. Interf. Cytok. Res.*, 20: 89-97.

- Kawasaki, L., Wysong, D., Diamond, R., Aguirre, J.** (1997) Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J. Bacteriol.* 179: 3284-92.
- Kwon-Chung, K.** (1998) Gene disruption to evaluate the role of fungal candidate virulence genes. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 381-389.
- Lee, A., Fox, J., Hazell, S.** (1993) Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective. *Infect. Immun.* May; 61(5):1601-10.
- Leidich, S.D., Ibrahim, A.S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., Fonzi, W., Mirbod, F., Nakashima, S., Nozawa, Y., Ghannoum, M.A.** (1998) Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 273: 26078-26086.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M.** (2000). Princípios de Bioquímica. Editora Savier. Ed. 2ª. Segunda reimpressão. São Paulo, S.P. Brasil.
- Lorenz, M.C & Fink, G.R.** (2001) The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature.* 412: 83-86.
- Lorenz, M.C. & Fink, G.R.** (2002) Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryot. Cell.* 1: 657-662.
- Luttik, M.A.H.; Kötter, P.; Salamons, F.A.; van der Klei, I.J.; van Dijken, J.P.; Pronk J.T.** (2000) The *Saccharomyces cerevisiae* ICL2 gene encodes a mitochondrial 2-methylisocitrate lyase involved in propionyl-coenzyme A metabolism. *J Bacteriol.* 182(24):7007-13.
- Mackay, E.M. & Pateman, J.A.** (1982) The regulation of urease activity in *Aspergillus nidulans*. *Biochem Genet.* Aug; 20(7-8):763-76.
- Marone, M., Mozzetti, S., De Ritis, D., Pierelli, L., Scambia, G.** (2001) Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biol Proced Online.* Nov 16; 3:19-25.
- Matsuoka, M., Ueda, Y., Aiba, S.** (1980) Role and control of isocitrate lyase in *Candida lipolytica*. *J Bacteriol.* Nov; 144(2):692-7.
- Matute, D.R., McEwen, J.G., Puccia, R., Montes, B.A., San-Blas, G., Bagagli, E., Rauscher, J.T., Restrepo, A., Morais, F., Niño-Vega, G., Taylor, J.W.** (2006) Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol. Biol. Evol.* 23(1): 65-73.

- McEwen, J.G., Garcia, A.M., Ortiz, B.L., Botero, S., Restrepo, A.** (1995) In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res.* Autumn; 26(3):305-6. Review.
- Mera, S.L.** (1995) Peptic ulcers and gastric cancer. *Br. J. Biomed. Sci.* Dec; 52(4):271-81.
- Mirbod-Donovan, F., Schaller, R., Hung, C.Y., Xue, J., Reichard, U., Cole, G.T.** (2006) Urease produced by *Coccidioides posadasii* contributes to the virulence of this respiratory pathogen. *Infect Immun.* Jan; 74(1):504-15.
- Missall, T.A., Lodge, J.K., McEwen, J.E.** (2004). Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryot. Cell.* 3: 835-846.
- Mobley, H.L., Island, M.D., Hausinger, R.P.** (1995) Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59: 451-480.
- Molinari-Madlum, E.E., Felipe, M.S., Soares, C.M.** (1999) Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Med Mycol.* Aug; 37(4):269-76.
- Moreira, S.F., Bailão, A.M., Barbosa, M.S., Jesuíno, R.S., Felipe, M.S., Pereira, M., de Almeida Soares, C.M.** (2004) Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis. *Yeast.* 21: 173-182.
- Moscardi-Bacchi, M., Brummer, E., Stevens, D.A.** (1994) Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. *J. Med. Microbiol.* 40: 159-64.
- Mukherjee, P.K.; Seshan, K.R.; Leidich, S.D.; Chandra, J.; Cole, G.T.; Ghannoum, M.A.** (2001) Reintroduction of the PLB1 gene into *Candida albicans* restores virulence in vivo. *Microbiology.* 147(Pt 9):2585-97.
- Muñoz-Eliás, E. & McKinney, J.D.** (2005) *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate liases 1 and 2 are jointly required for *in vitro* growth and virulence. *Nature Med.* 11(6):638-44.
- Murphy, J.W., Bistoni, F., Deepe, G.S., Blackstock, R.A., Buchanan, K., Ashman, R.B., Romani, L., Mencacci, A., Cenci, E., Fe d'Ostiani, C., Del Sero, G., Calich, V.L., Kashino, S.S.** (1998) Type 1 and type 2 cytokines: from basic science to fungal infections. *Med Mycol.* 36 Suppl 1:109-18. Review.
- Nathan, C. & Shiloh, M.U.** (2000) Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97: 8841-8848.
- Navarro-Garcia, F., Sanchez, M., Nombela, C., Pla, J.** (2001) Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Rev.* Apr; 25(2):245-68.

- Odds, F.C., Gow, N.A., Brown, A.J.** (2001) Fungal virulence studies come of age. *Genome Biol.*;2(3):REVIEWS1009. Review.
- Paiva, S., Devaux, F., Barbosa, S., Jacq, C., Casal, M.** (2004) Ady2p is essential for the acetate permease activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. Feb; 21(3):201-10.
- Peterson, S.W. & 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 Microbiol*. Oct;36(10):2918-25.
- Pflock, M., Kennard, S., Delany, I., Scarlato, V., Beier, D.** (2005) Acid-induced activation of the urease promoters is mediated directly by the ArsRS two-component system of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* Oct ;73(10):6437-45.
- Rapplee, C.A., Engle, J.T., Goldman, W.E.** (2004) RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. *Mol. Microbiol.* Jul; 53(1):153-65.
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E.** (2001) *Biologia Vegetal*. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, R.J.
- Restrepo, A. & Jimenez, B.E.** (1980) Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *J Clin Microbiol.* 12(2):279-81.
- Restrepo, A., Salazar, M.E., Cano, L.E., Stover, E.P., Feldman, D., Stevens, D.A.** (1984) Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* Nov;46(2):346-53.
- Restrepo, A., McEwen, J.G., Castaneda, E.** (2001) The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol.* Jun; 39(3):233-41. Review.
- Ricci, G., Mota, F.T., Wakamatsu, A., Serafim, R.C., Borra, R.C., Franco, M.** (2004) Canine paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol.* Aug; 42(4):379-83.
- Romani, L.** (1997) The T cell response against fungal infections. *Curr Opin Immunol.* 9: 484-490.
- Romani, L.** (2004) Immunity to fungal infections. *Nature Reviews.* Jan; 4: 1-13.
- Rooney, P.J. & Klein, B.S.** (2002) Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cell Microbiol.* Mar; 4(3):127-37. Review.

- Rude, T.H.; Toffaletti, D.L.; Cox, G.M.; Perfect, J.R.** (2002) Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 70(10):5684-94.
- Rumbley, C.A. & Phillips, S.M.** (1999) The schistosome granuloma: an immunoregulatory organelle. *Microbes Infect.* Jun ;1(7):499-504.
- Sambrook J. & Russel, D.W.** (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual.* ed. 3. Cold Spring Harbor, New York.
- San-Blas, G. & San-Blas, F.** (1977) *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. *Mycopathologia.* Dec 16; 62(2):77-86.
- San-Blas, F. & San-Blas, G.** (1982) Bioquímica y dimorfismo en *Paracoccidioides brasiliensis*, in Del Negro, G.; Lacaz, C. S.; Fiorillo, A. M.; Paracoccidioidomicose - blastomicose sul-americana ed. Sarvier-EDUSP. São Paulo. pg. 35-58.
- San-Blas G.** (1985) *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall glucans, pathogenicity, and dimorphism. *Curr Top Med Mycol.*1:235-57. Review.
- San-Blas G & San-Blas F.** (1994) Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A & Del Negro G. (Eds), *Paracoccidioidomycosis*, CRS Press, Boca Raton. Chapter 4, 49-66.
- San-Blas, G. & Niño-Vega, G.** (2001) *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In: Cihlar RL, Calderone RA, eds. *Fungal Pathogenesis. Principles and Clinical Applications.* New York: Marcel Dekker. 205-226.
- San-Blas, G., Niño-Vega, G., Iturriaga, T.** (2002) *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol.* Jun; 40(3):225-42.
- Sandeman, R.A., Hynes, M.J.** (1989) Isolation of the *facA* (acetyl-coenzyme A synthetase) and *acuE* (malate synthase) genes of *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet.* Jul;218(1):87-92.
- Santangelo, R.T., Nouri-Sorkhabi, M.H., Sorrell, T.C., Cagney, M., Chen, S.C., Kuchel, P.W., Wright, L.C.** (1999) Biochemical and functional characterisation of secreted phospholipase activities from *Cryptococcus neoformans* in their naturally occurring state. *J. Med. Microbiol.* 48: 731-40.
- Schaffner, A., Davis, C.E., Schaffner, T., Markert, M., Douglas, H., Braude, A.I.** (1986) In vitro susceptibility of fungi to killing by neutrophil granulocytes discriminates between primary pathogenicity and opportunism. *J. Clin. Invest.* 78: 511-524.

- Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M.I., Liu, Y., Mangan, J.A., Monahan, I.M., Dolganov, G., Efron, B., Butcher, P.D., Nathan, C. and Schoolnik, G.K.** (2003) Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *J. Exp. Med.* 198: 693-704.
- Schöler, A. & Schüller, H.J.** (1994) A carbon source-responsive promoter element necessary for activation of the isocitrate lyase gene ICL1 is common to genes of the gluconeogenic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* Jun; 14(6):3613-22.
- Selitreff, C.P. & Nakata, M.** (2003) New cell wall targets for antifungal drugs. *Current Opinion in Investigational Drugs.* 4 (2).
- Silva, M.F., Bocca, A.L., Ferracini, R.J., Figueiredo, F., Silva, C.L.** (1997) Cellular requirements for immunomodulatory effects caused by cell wall components of *Paracoccidioides brasiliensis* on antibody production. *Clin Exp Immunol.* Aug;109(2):261-71.
- Singer-Vermes, L.M., Burger, E., Franco, M.F., Di-Bacchi, M.M., Mendes-Giannini, M.J., Calich, V.L.** (1989) Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *J. Med. Vet. Mycol.* 27(2):71-82.
- Souto, J.T., Figueiredo, F., Furlanetto, A., Pfeffer, K., Rossi, M.A. and Silva, J.S.** (2000) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am. J. Pathol.* 156: 1811-1820.
- Tabuchi, T. & Uchiyama, H.** (1975) Methylcitrate condensing and methylisocitrate cleaving enzymes: evidence for the pathway of oxidation of propionyl-CoA to pyruvate via C₇-tricarboxylic acids. *Agric. Biol. Chem.* 39:2035-2042.
- Tavares, A.H., Silva, S.S., Bernardes, V.V., Maranhão, A.Q., Kyaw, C.M., Poças-Fonseca, M., Silva-Pereira, I.** (2005) Virulence insights from the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genetics and Molecular Researches.* 4 (2): 358-371.
- Thomas, G.H., Connerton, I.F., Fincham, J.R.** (1988) Molecular cloning, identification and transcriptional analysis of genes involved in acetate utilization in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol.* Sep; 2(5):599-606.
- Tsuda, M., Karita, M., Morshed, M.G., Okita, K., Nakazawa, T.** (1994) A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infect. Immun.* Aug; 62(8):3586-9.

- Tzschoepe, K., Augstein, A., Bauer, R., Kohlwein, S.D., Barth, G.** (1999) trans-dominant mutations in the GPR1 gene cause high sensitivity to acetic acid and ethanol in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*. Nov; 15(15):1645-56.
- Wanke, B. & Londero, A.T:** (1994) Epidemiology and paracoccidiomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A & Del Negro G. (Eds), Paracoccidioidomycosis, CRS Press, Boca Raton. 109-120.
- Wysong, D.R., Christin, L., Sugar, A.M., Robbins, P.W., Diamond, R.D.** (1998) Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect. Immun.* 66: 1953-1961.
- Yang, Y.L.** (2003) Virulence factors of *Candida* species. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 36: 223-228.
- Zacharias, D., Ueda, A., Moscardi-Bacchi, M., Franco, M., San-Blas, G.** (1986) A comparative histopathological, immunological, and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycosis induced in mice by three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *J. Med. Vet. Mycol.* Dec; 24(6):445-54.

*“A vida é como uma música:
o começo é meio sem ritmo;
o meio é a melhor parte;
e o final... dá vontade de voltar e ouvir
de novo.”*

(autor desconhecido)