

**Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

**“Busca dos genes de *Paracoccidioides brasiliensis* relacionados às
funções da mitocôndria”**

Alexia Regina Mandolesi

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas como
complementação dos créditos necessários para
obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas

São José dos Campos – SP

2004

**Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

**“Busca dos genes de *Paracoccidioides brasiliensis* relacionados às
funções da mitocôndria”**

Alexia Regina Mandolesi

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas como
complementação dos créditos necessários para
obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Francisco Gorgônio da Nóbrega

São José dos Campos – SP

2004

**“Busca dos genes de *Paracoccidioides brasiliensis* relacionados às
funções da mitocôndria”**

Alexia Regina Mandolesi

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Marina Pasetto Nóbrega, Presidente (UNIVAP) _____

Prof. Dr. Francisco Gorgônio da Nóbrega, Orientador (UNIVAP) _____

Prof. Dr. André Luiz Vettore (Inst. Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer)

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D

São José dos Campos, 20 de fevereiro de 2004.

Dedico este trabalho à minha família e ao
Dr. Carlos Frederico Distéfano Pinto,
pelo apoio e confiança dedicados.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos Diretores do Instituto de Oncologia do Vale, pelo apoio e incentivo ao meu crescimento profissional; aos meus pais, por sempre acreditarem em mim; ao meu namorado, Wellington Mattos de Oliveira Costa, pelo apoio emocional e, muitas vezes, técnico; ao meu orientador, Francisco G. Nóbrega, pela calma com que passava seus ensinamentos e pela compreensão dada aos meus limites de tempo e horário; ao professor Diógenes C. D. Ribeiro, pela ajuda na parte computacional; e à eterna amiga Márcia Sampaio Campos, pela generosidade e atenção inigualáveis, que nunca esquecerei.

“Pode-se alcançar a sabedoria por três caminhos.

O primeiro caminho é o da meditação, que é o mais nobre.

O segundo é o da imitação, que é o mais fácil e o menos satisfatório.

Em terceiro lugar, existe o caminho da experiência, que é o mais difícil.”

Confúcio (Kung-Fu-Tse)

Resumo

O fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (PB) é o agente etiológico de uma micose sistêmica – a paracoccidioidomicose. As mitocôndrias são organelas que sofrem importantes alterações funcionais durante a transição dimórfica e neste estudo, utilizando ferramentas de bioinformática, buscamos a identificação específica de genes nucleares codificantes para proteínas de função mitocondrial por comparação com as proteínas assim identificadas presentes nos genomas de *Saccharomyces cerevisiae* (787 proteínas) e *Homo sapiens* (984 proteínas). A análise através do BLAST foi utilizada para alinhar um total de 15.319 seqüências nucleotídicas traduzidas de PB contra as seqüências de *H. sapiens* e *S. cerevisiae*. Somente pareamentos com “E-value” menor ou igual a 10^{-5} foram selecionados para categorização funcional. Das seqüências de PB, 10,24% (1.569) exibiram similaridade significativa contra proteínas humanas ou de levedura. A classificação funcional resultou nas categorias: 1) crescimento e divisão celular (3,06%); 2) defesa, morte e envelhecimento celular (4,4%); 3) transporte e mecanismos de transporte celular (8,54%); 4) síntese de DNA/RNA/proteínas (4,4%); 5) geração de energia (17,65%); 6) metabolismo (26,8%); 7) proteases (5,67%); 8) endereçamento protéico (0,64%); 9) sinalização (3,06%); 10) função estrutural (2,88%); 11) função desconhecida (22,9%). As seqüências de PB selecionadas foram comparadas com as seqüências do banco de dados não redundante do GenBank®. *Neurospora crassa* (55,77%) e *Emericella nidulans* (10,4%) apareceram nos resultados com maior freqüência. Este estudo servirá de base para investigações sobre as funções e biogênese da mitocôndria neste organismo e para análise da expressão destes genes durante o ciclo de vida de PB.

Palavras-Chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, mitocôndria, "data mining"

Área de conhecimento: Biologia Molecular

Abstract

The thermo-dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (PB) is the causative agent of a systemic infectious disease - paracoccidioidomycosis. Mitochondria are important organelles that are subjected to functional alterations during the dimorphic transition. In this study we sought the identification of nuclear genes that code for proteins of mitochondrial function by comparison with the well categorized mitochondrial proteins of *Saccharomyces cerevisiae* (787 proteins) and *Homo sapiens* (984 proteins). The BLAST program analysed 15,319 translated nucleotide sequences from PB against *H. sapiens* and *S. cerevisiae* proteins. We selected hits with an e-value equal or better than 10^{-5} for analysis and found 1,569 sequences from PB (10,24%) with significant similarity with human or yeast proteins. Functional classification resulted in the following categories: 1) cell growth, cell division (3,06%); 2) cell defense, cell death and aging (4,4%); 3) cellular transport and transport mechanisms (8,54%); 4) DNA/RNA/protein synthesis (4,4%); 5) energy (17,65%); 6) metabolism (26,8%); 7) proteases (5,67%); 8) protein destination (0,64%); 9) signaling (3,06%); 10) structural (2,88%); 11) unknown/other (22,9%). The selected PB sequences were compared with the non-redundant database from GenBank®. Most hits identified *Neurospora crassa* (55,77%) and *Emericella nidulans* (10,4%) genes. This investigation will support studies on the function and biogenesis of PB mitochondria and expression analysis of those genes during the life cycle of PB.

Key-words: *Paracoccidioides brasiliensis*, mitochondria, data mining

Knowledge area: Molecular Biology

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	1
1.2 Mitocôndria.....	7
1.3 “Data Mining”.....	13
2. Material e métodos.....	18
2.1 Construção das bibliotecas.....	18
2.2 Preparação de DNA/Sequenciamento.....	18
2.3 Varredura dos bancos de dados.....	19
2.4 Apresentação dos resultados (Tabela3).....	20
3. Resultados.....	23
4. Discussão.....	30
5. Referências Bibliográficas.....	33
6. Anexos.....	44

Lista de Tabelas

TABELA 1 – Número de pareamentos significativos (E-value $\leq 10^{-5}$) de genes putativos de *Paracoccidioides brasiliensis* contra os produtos gênicos de *S. cerevisiae* e *H. sapiens* relacionados à função mitocondrial.....44

TABELA 2 – Distribuição do número de seqüências nucleotídicas de *P. brasiliensis* de função mitocondrial identificadas por organismo que fornece proteínas com maior similaridade encontradas no nr do GenBank® - (NCBI),,45

TABELA 3 – Organização da TabelaPrincipal (disponível em http://200.136.178.19/web_g/DrNobrega.htm) com os resultados do projeto.....48

Lista de Figuras

FIGURA 1 – Classificação funcional das seqüências protéicas de *Paracoccidioides brasiliensis* relacionadas à função mitocondrial.....49

FIGURA 2 – Frequência comparada das espécies apresentando proteínas com alta similaridade aos produtos gênicos de *P. brasiliensis* (busca contra as seqüências de proteínas presentes no nr do GenBank® - NCBI).....50

Lista de abreviaturas e símbolos

ADP	-	adenosina di-fosfato
AIF	-	fator indutor de apoptose
ALLBANK		banco de sequências gerado para o projeto
ANT	-	translocador de nucleotídeo adenina
ATP	-	adenosina tri-fosfato
BLAST-		algoritmo de busca de alinhamento local básico
Ca ²⁺	-	íon cálcio
CO ₂	-	gás carbônico
CoQ	-	coenzima Q ₁₀
COX	-	citocromo c oxidase
DNA	-	ácido desoxirribonucleico
EST	-	etiqueta de sequência expressa
ETC	-	cadeia transportadora de elétrons
Fe/S	-	centro ferro/enxofre
FKS	-	gene regulador do ciclo celular
G.O.	-	Gene Ontology®
Gp43	-	glicoproteína de 43-kilodáltons
H ₂	-	hidrogênio molecular
H ⁺	-	próton
H ₂ O ₂	-	peróxido de hidrogênio
HSP	-	proteína de choque térmico
cDNA	-	DNA complementar por cópia de mRNA
mtDNA		DNA mitocondrial
NADH		nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NCBI	-	National Center for Biotechnology Information
nr	-	não-redundante
ORF	-	“open reading frame” ou quadro aberto de leitura
PB	-	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PbY20-		proteína expressa na fase leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i>
PCM	-	paracoccidioidomicose

- PCR - reação de amplificação de DNA em cadeia por polimerase
- RNA - ácido ribonucleico
- RST - etiqueta de seqüência aleatória (do DNA genômico)
- TCA - ciclo do ácido tricarboxílico

1 – Introdução

1.1 – *Paracoccidioides brasiliensis*

O fungo dimórfico termo-dependente *Paracoccidioides brasiliensis* (PB) é o causador da paracoccidioidomicose (MCEWEN et al., 2000; SILVA et al., 2001; MIYAJI et al., 2003; RICHARDSON; WARNOCK, 1997). Encontra-se taxonomicamente classificado – através de técnicas moleculares - no filo Ascomycota, ordem Onygenales e família Onygenaceae (SAN-BLAS et al., 2002).

Este fungo é o agente etiológico de uma infecção pulmonar benigna transitória em indivíduos normais, que ocorre após a inalação de seus esporos que foram liberados no ar. Pode ocorrer infecção crônica dos pulmões ou outros órgãos, em particular da pele e das membranas mucosas, através de uma reativação tardia (RICHARDSON; WARNOCK, 1997).

A paracoccidioidomicose (PCM) é mais prevalente na América do Sul e Central (RICHARDSON; WARNOCK, 1997; MIYAJI et al., 2003). A maior incidência da doença ocorre no Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela (RASTREPO-MORENO, 1993). A infecção também foi diagnosticada fora destas regiões entre indivíduos que visitaram ou residiram em áreas endêmicas (RICHARDSON; WARNOCK, 1997).

Embora o fungo tenha sido encontrado no solo em algumas ocasiões, geralmente em regiões classificadas como florestas montanhosas subtropicais, o entendimento de seu habitat natural é ainda limitado (RICHARDSON; WARNOCK, 1997). O tatu, *Dasypus novemcinctus* tem sido confirmado como o reservatório primário natural do *Paracoccidioides brasiliensis* (HEBELER-BARBOSA et al., 2003) encontrando-se preferencialmente em florestas úmidas e sombreadas (BAGAGLI, et al. 2003).

Em regiões endêmicas, a infecção por *P. brasiliensis* é frequentemente adquirida antes dos 20 anos de idade (RICHARDSON; WARNOCK, 1997), sendo que a forma sintomática da infecção é mais prevalente entre as idades de 30 e 50 anos (BLOTTA et al., 1993). Mais de 90% dos casos ocorrem em homens (RICHARDSON; WARNOCK, 1997). O estrógeno inibe a transição de micélio ou conídio (sua forma saprofítica) em levedura

(sua forma parasitária) *in vitro* (ARISTIZABAL et al., 1998). Influências hormonais na transformação do fungo (micélio ou conídio para levedura) têm sido demonstradas. Proteínas de ligação ao estrógeno têm sido detectadas no citosol do fungo e durante a transformação novas proteínas são produzidas como resultado da incorporação de estradiol (BRUMMER et al., 1993).

Sob temperaturas que variam de 35.°C a 37.°C, o *Paracoccidioides brasiliensis* cresce como levedura tanto *in vivo* quanto *in vitro*. À temperatura ambiente o mesmo cresce em sua forma de micélio, como hifas ramificadas e septadas das quais clamidósporos e aleurioconídios são produzidos. A conversão da forma micelial do fungo para a forma leveduriforme é dependente tanto de fatores relacionados à temperatura (MEDOFF et al., 1987) quanto de fatores nutricionais (MIYAJI et al., 2003). A transição morfológica está correlacionada com a infecção no hospedeiro humano (FELIPE et al., 2003). No tecido, o fungo apresenta-se na forma de células globosas ou ovais grandes (RICHARDSON; WARNOCK, 1997). Os clamidósporos de *P. brasiliensis* podem exercer um importante papel no processo de conversão da forma de micélio para levedura (MIYAJI et al., 2003). Tal transição resulta em modificações na composição da parede celular, provavelmente mediadas por enzimas de membrana (BRUMMER et al., 1993). Os polímeros mudam de beta-glucanos para alfa-glucanos, possivelmente para evitar que os beta-glucanos desencadeiem a resposta inflamatória. Estrógenos inibem esta transição, o que aumenta a incidência da doença em homens (BORGES-WALMSLEY et al., 2002).

Mudanças fisiológicas características acompanham a transição da fase micelial para a leveduriforme. Com a mudança de temperatura ocorre um desacoplamento parcial da fosforilação oxidativa e um decréscimo nos níveis de ATP, na taxa de respiração e na concentração de componentes que transportam elétrons. As células entram num estado onde a respiração espontânea cessa e, finalmente, passam para uma fase de recuperação na qual ocorre a transformação para a forma de levedura (MEDOFF et al. 1987). Deste modo é possível verificar alterações na função mitocondrial que acompanham as alterações morfológicas que caracterizam a forma infectante.

O *Paracoccidioides brasiliensis*, como um organismo dimórfico, está sujeito ao estresse por calor como uma característica regular de seu ciclo celular. A conversão de

micélio para levedura é um passo crucial para o estabelecimento da infecção (JESUINO et al., 2002). Proteínas de choque térmico (HSP) são produzidas em grandes quantidades por células em resposta ao rápido aumento na temperatura e outros tipos de estresse ambiental (IZACC et al., 2001). As proteínas HSPs são altamente conservadas através da barreira das espécies e atuam em funções fundamentais na fisiologia celular. A nomenclatura HSP90, HSP70 e HSP60 reflete a massa molecular aproximada das mesmas. Em fungos patogênicos, aparecem ligadas à resposta imune (MATTHEWS et al., 1998).

O gene HSP70 é induzido durante o choque térmico das células leveduriformes à 42.°C e na transição de micélio para levedura. Tal diferenciação exerce o efeito adaptativo de aumentar a resistência do organismo ao ambiente estressante, o que pode ser necessário para a sobrevivência do parasita nas células de mamíferos (MCEWEN et al., 2000).

Além da diferente capacidade dos isolados de causar doença e de dependerem da transição dimórfica para a ocorrência da infecção, a resposta imune do hospedeiro também tem um papel crucial na habilidade do *Paracoccidioides brasiliensis* de causar a doença (MCEWEN et al., 2000). A susceptibilidade de indivíduos à paracoccidioidomicose tem base genética, ocorrendo resposta imune celular deprimida em pacientes susceptíveis. Em indivíduos resistentes à doença ocorre a formação de granuloma estimulado por citocinas e produção de óxido nítrico (BORGES-WALMSLEY et al., 2002).

O período de latência, a persistência da doença e a aparente falta de eficácia da imunidade humoral nos indivíduos susceptíveis, são consistentes com o fato do *P. brasiliensis* existir como um patógeno intra-celular facultativo (BORGES-WALMSLEY et al., 2002).

Os pulmões são geralmente o sítio inicial da infecção, que se espalha para os vasos linfáticos e os linfonodos regionais (RICHARDSON; WARNOCK, 1997) ou ocorre disseminação hematogênica para outros órgãos (FRANCO,1987). A maioria dos indivíduos normais não desenvolve sinais ou sintomas, mas uma forma aguda disseminada de infecção pode ocorrer em crianças e adolescentes, na qual um aumento dos linfonodos superficiais ou viscerais é a manifestação principal (RICHARDSON; WARNOCK, 1997). O envolvimento do sistema mononuclear fagocítico é o achado clínico mais comum na forma aguda, principalmente descrito em crianças e adultos jovens. Inflamação granulomatosa

crônica é um achado histológico freqüente, às vezes seguida de intensa fibrose. A disfunção pulmonar representa a mais importante causa de morte em pacientes com paracoccidiodomicose (SHIKANAI-YASUDA et al., 1997).

Infecção crônica progressiva ocorre na maioria dos pacientes com a doença, sendo resultado da reativação de uma lesão quiescente. A doença é freqüentemente indolente no início, sendo que os sintomas clínicos tais como tosse produtiva, febre, calores noturnos, hemoptise e perda de peso aparecem muito depois do indivíduo deixar uma região endêmica. A boca e o nariz são os sítios mais comuns da paracoccidiodomicose mucocutânea. Lesões ulceradas dolorosas desenvolvem-se nas gengivas, língua, lábios ou palato e podem progredir por semanas ou meses, prejudicando a alimentação. Perfuração do palato ou do septo nasal e lesões na laringe podem ocorrer. Linfadenopatias são comuns em pacientes com lesões bucais. A infecção de linfonodos cervicais pode resultar na formação de abscessos (RICHARDSON; WARNOCK, 1997).

As manifestações clínicas e radiológicas da paracoccidiodomicose crônica podem ser confundidas com tuberculose, histoplasmose ou leishmaniose. Para o diagnóstico definitivo da paracoccidiodomicose, colônias de micélios podem ser obtidas após incubação a 25-30.°C por 2-3 semanas. Culturas de micélios raramente esporulam, mas subculturas dos isolados em ágar sangue a 37.°C podem resultar na produção de uma forma unicelular. Se identificação mais rápida é requerida (24h), a cultura inicial do micélio pode ser submetida a um teste de exoantígeno. O teste de fixação de complemento é positivo em mais de 90% dos pacientes com paracoccidiodomicose ativa. Reações cruzadas podem ocorrer com soros de pacientes com blastomicose, histoplasmose, esporotricose e outras infecções severas. O teste de imunodifusão é positivo em 80-90% dos pacientes com a infecção ativa; reações cruzadas podem ocorrer, mas são incomuns. Baixos títulos podem persistir por um longo tempo após a cura da infecção (RICHARDSON; WARNOCK, 1997).

Um antígeno específico para *Paracoccidioides brasiliensis*, a glicoproteína de 43-kDa (Gp43) foi identificado, caracterizado e clonado, o que aumentou a reprodutibilidade e especificidade de testes sorológicos (BRUMMER et al., 1993). O gp43 é protetor contra

PCM murina e é um provável fator de virulência (MORAIS et al., 2000). Métodos de "nested-PCR" também podem ser úteis para o diagnóstico de PCM (SANO et al., 2001).

A reação de PCR tem sido efetiva para a detecção de uma grande variedade de microorganismos e pode ser útil no diagnóstico de PCM. Utilizando primers especificamente designados para ambas as regiões 5.8S e 28S do DNA ribossomal, foi possível discriminar entre *Paracoccidioides brasiliensis* e outros fungos patogênicos (MOTOYAMA et al., 2002).

Pacientes com paracoccidioidomicose requerem tratamento com antifúngicos por longo tempo. Anfotericina B tem sido a terapia efetiva. Derivados azólicos têm melhorado o prognóstico e facilitado a terapia, sendo o itraconazol a droga de escolha (BRUMMER et al., 1993). A maioria dos pacientes responde ao tratamento antifúngico, mas a recidiva é um problema comum, de modo que pacientes tratados devem ser reexaminados a intervalos regulares (RICHARDSON; WARNOCK, 1997).

Sugere-se que a resistência à paracoccidioidomicose está associada com atividades de células-T, macrófagos e células-B, com mediação do interferon-gama (CANO et al., 1995). A depressão da resposta imune mediada por células tem sido associada à doença severa em humanos (BRUMMER et al., 1993).

A proteína PbY20, que é expressa apenas na forma de levedura, provavelmente possui função alérgica em paracoccidioidomicose, ou pode atuar na manutenção da estrutura da cromatina da levedura (MCEWEN et al., 2000).

1,3- β -D-glucano é um polímero da parede celular fúngica sintetizado pela enzima 1,3- β -D-glucano sintase. Uma subunidade desta proteína integral de membrana foi primeiramente descrita como produto do gene *FKS1* de *Saccharomyces cerevisiae*. Análise computacional de Fks1p de *Paracoccidioides brasiliensis* sugere uma estrutura similar às de proteínas transmembranas, tal como FksAp (PEREIRA et al., 2000). O gene *FSK1* é regulado no ciclo celular e predomina durante o crescimento em glicose. *FKS2* é essencial para a esporulação e é expresso na ausência de glicose. (MAZUR et al., 1995, por PEREIRA et al., 2000). A ocorrência de mais de uma seqüência semelhante à da seqüência *FKS* em *Paracoccidioides brasiliensis* pode sugerir uma função similar para a família *FKS* neste parasita, tal como a regulação genética diferencial (PEREIRA et al., 2000).

A análise cromossômica realizada por Feitosa et al. (2003) através de eletroforese em gel de campo pulsado e hibridização de DNA verificou a existência de seqüências repetitivas nos cromossomos de diferentes isolados clínicos e ambientais, indicando a diferença entre isolados naturais, como também a possível existência de isolados haplóides e diplóides (ou aneuplóides) do fungo.

1.2 - Mitocôndria

A mitocôndria é uma organela que funciona como o principal sítio para a geração de ATP na maioria dos tecidos. Além disso, participa da regulação de Ca^{2+} intracelular, termogênese e controle da apoptose. Funciona como principal geradora de espécies de oxigênio reativo, podendo induzir à morte celular em condições de estresse oxidativo (KOWALTOWSKI, 1997).

Estima-se que a mitocôndria sintetize 2% a 5% das proteínas requeridas para suas funções, de modo que 95% a 98% das proteínas requeridas são codificadas pelo genoma nuclear (GRAY et al., 1999).

A fim de gerar ATP continuamente, a mitocôndria remove elétrons de substratos reduzidos e transfere-os ao oxigênio através de um grupo especializado de complexos respiratórios (FIGURA 4). Uma vez que a membrana mitocondrial interna é normalmente bastante impermeável aos prótons, o gradiente gerado pela cadeia respiratória produz um potencial de prótons através da membrana mitocondrial interna, o qual é utilizado pela ATP sintase mitocondrial para gerar ATP de ADP mais fósforo inorgânico (KOWALTOWSKI, 1997).

A mitocôndria exerce um importante papel na regulação dos sinais de Ca^{2+} citosólicos. As mitocôndrias são dotadas de múltiplos mecanismos de transporte de Ca^{2+} através da membrana interna, regulando vários mecanismos celulares sensíveis ao Ca^{2+} , inclusive apoptose (SMALI et al., 2000). A capacidade total de acúmulo de Ca^{2+} da mitocôndria pode ser bastante grande, de modo que o fosfato inorgânico é acumulado em paralelo para compensar as mudanças no gradiente de pH mitocondrial através da membrana mitocondrial interna (KOWALTOWSKI, 1997).

A mitocôndria apresenta passos regulatórios que promovem a dissipação de energia, tais como as proteínas desacopladoras e a oxidase alternativa, que parecem promover a termogênese, ocorre quando a energia química contida nos substratos reduzidos é liberada, mas não explorada para a síntese de ATP (KOWALTOWSKI, 1997).

A atividade mitocondrial é fortemente modulada durante a transição dimórfica de *Paracoccidioides brasiliensis*. A atividade da organela é essencial para o funcionamento

dos eucariotos devido ao seu papel na geração de energia pela completa oxidação dos substratos (fosforilação oxidativa) e em outras funções essenciais aparentemente independentes da respiração como a importação de proteínas sintetizadas no citoplasma (BAKER ; SCHATZ, 1991; SCHATZ, 1995) e a síntese, montagem e exportação de centros Fe/S pela organela (LILL E KISPAL, 2000).

Estudos do DNA mitocondrial (mtDNA) e sua expressão têm confirmado a raiz eubacteriana deste genoma. O mtDNA codifica um número limitado de RNAs e proteínas essenciais para formação de uma mitocôndria funcional. Em grande parte, proteínas de mtDNA são componentes dos complexos respiratórios I (NADH: ubiquinona oxidoreductase; *sdh*), III (ubiquinol: citocromo c oxidoreductase; *cob*), e IV (citocromo c oxidase; *cox*) da cadeia de transporte de elétrons assim como o complexo V (adenosina trifosfato sintase; *atp*). Apesar do papel genético do mtDNA parecer ser universalmente conservado, este genoma exhibe variação em tamanho e tipos de genes presentes sua ordem ou organização, presença de introns e expressão (GRAY et al., 1999).

A maioria das células contém centenas a milhares de mitocôndrias. Imagina-se que estas organelas apareceram há cerca de 1,5 bilhões de anos por uma associação simbiótica entre uma célula proto-eucariótica e uma bactéria (MARGULIS,1970). A hipótese mais disseminada supõe que a célula proto-eucariótica seria incapaz de respirar e a bactéria associada teria capacidade respiratória podendo utilizar o oxigênio como aceptor final de elétrons. Recentemente duas novas propostas para esta associação que resultou na mitocôndria foram detalhadas: a de Martin e Müller (1998) na qual a simbiose seria entre uma α -proteobactéria produtora de hidrogênio com arqueobactérias capazes de obter energia através do H_2 e CO_2 . A segunda hipótese propõe um evento endossimbiótico adicional envolvendo uma δ -proteobactéria do tipo *Rickettsia* (LOPEZ-GARCIA ; MOREIRA, 1999). Essas últimas são parasitas intracelulares e parecem estar filogeneticamente relacionadas à mitocôndria (ANDERSSON et al., 1998). A mitocôndria moderna retém grande número de características que refletem sua origem endossimbiótica. Estas incluem uma estrutura de membrana dupla e um genoma mitocondrial circular com transcrição mitocondria-específica, maquinaria de tradução com características bacterianas, e sistemas de importação das demais proteínas que são produzidas no citoplasma (WALLACE,

1999). A análise dos genomas mitocondriais revela a grande diversidade no número de genes presentes e na organização dos mesmos. Examinando por exemplo apenas o número de genes codificadores para proteínas presentes em diferentes organismos temos 3 em *Plasmodium falciparum* (COX1 e 2 e COB), 13 polipeptídeos no homem e outros vertebrados, entre 27 e 37 em plantas e 62 genes no protozoário *Reclinomonas americana* (PALMER, 1997). Esta diversidade reflete a variabilidade no ritmo de perda de genes do genoma mitocondrial ancestral por não serem necessários, por redundância com genes ativos presentes no núcleo da célula ou por transferência dos mesmos para o genoma nuclear (THORSNESS; FOX, 1993). Os estudos genômicos suportam a teoria endossimbiótica (MARGULIS, 1970) da origem da organela e mtDNA do protozoário *Reclinomonas americana* é o que mais se parece com o suposto genoma ancestral que seria o de uma α -proteobactéria do grupo das riquetsias com 97 genes ao todo, e 18 proteínas nunca antes encontradas em genomas mitocondriais como quatro subunidades de uma RNA polimerase de tipo bacteriano (LANG et al., 1997).

A mitocôndria gera a maior parte da energia das células animais. Os elétrons que passam pela cadeia de transporte de elétrons, na fosforilação oxidativa (FIGURA 3), são gerados pelo NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida), que é produzido por oxidação de nutrientes tais como glicose, e cujos equivalentes redutores são transferidos ao oxigênio molecular. A cadeia de transporte de elétrons consiste de quatro complexos de enzimas respiratórias dispostos em orientação específica na membrana mitocondrial interna. A passagem de elétrons entre tais complexos libera energia que é armazenada na forma de um gradiente de prótons através da membrana e é usada pela ATP sintase para transformar ADP e fosfato em ATP (SARASTE, 1999).

Em mitocôndrias de humanos, as proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa estão localizadas dentro da membrana mitocondrial interna e incluem os componentes da cadeia transportadora de elétrons (ETC), ATP sintase e o translocador de nucleotídeo adenina (ANT). A ETC oxida o hidrogênio derivado da oxidação de ácidos orgânicos tais como piruvato e ácidos graxos com oxigênio para gerar água. Os elétrons do NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo), são transferidos para o complexo respiratório I (NADH desidrogenase) e então à coenzima Q_{10} (CoQ), e os elétrons do succinato no ciclo

do ácido tricarboxílico (TCA) são transferidos ao complexo II (succinato desidrogenase, SDH) e daí à CoQ. Da CoQ, os elétrons são transferidos ao complexo III, depois ao citocromo c (cyt c), que os transfere ao complexo IV (citocromo c oxidase, COX) e finalmente ao oxigênio molecular para originar H₂O. A energia liberada é usada para liberar prótons (H⁺) para fora da membrana interna mitocondrial a fim de criar um gradiente eletroquímico que é positivo e ácido do lado de fora e negativo e alcalino no lado da matriz mitocondrial. Isto cria um capacitor que pode ser despolarizado pelo transporte de prótons de volta para a matriz através de um canal de prótons no componente de membrana F₀ da ATP sintase. O fluxo de prótons orienta a reação de ADP e P inorgânico, gerando ATP, que é exportado para o citosol. A fosforilação oxidativa é a maior fonte endógena de espécies reativas de oxigênio (O₂⁻, H₂O₂ e OH⁻). (WALLACE, 1999).

A membrana mitocondrial externa é a fronteira entre a mitocôndria e o resto da célula, e as atividades moleculares neste local determinam o comportamento mitocondrial. A morfologia e a distribuição das mitocôndrias depende da interação regulada da membrana mitocondrial externa com o citosol e, em particular, com componentes do citoesqueleto. Tais interações poderiam servir para direcionar o movimento mitocondrial, transportar a mitocôndria para regiões de crescimento celular ou áreas de grande necessidade metabólica, manter a morfologia da rede mitocondrial e a posição mitocondrial no citoplasma e sua movimentação incluindo aquelas durante a divisão celular (YAFFE, 1999).

A mitocôndria possui um importante papel no processo de morte celular. Na ausência de ATP as células morrem por necrose, mas se ATP suficiente está disponível, e estão presentes os sinais apropriados que indicam a necessidade de morte da célula em questão, uma cascata de mudanças é iniciada para levar a célula à apoptose ou morte celular programada. O citocromo c normalmente funciona como parte da cadeia respiratória, mas quando liberado no citosol pode tornar-se componente crítico do processo da apoptose, ativando caspases e, se o ATP estiver disponível, causando morte celular (PALMER, et al., 2000).

Alguns fatores bem estudados de promoção de morte celular, situados na membrana mitocondrial interna incluem o *cyt c*, o fator indutor de apoptose (AIF) e caspases, que são formas latentes de proteases (WALLACE, 1999).

Vários estímulos fisiológicos e patológicos desencadeiam um aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial. A mitocôndria libera fatores apoptogênicos através da membrana externa e dissipa o gradiente eletroquímico da membrana interna. Um complexo multiproteico dinâmico situado entre as membranas interna e externa pode funcionar como sensor para estresse, dano e certos sinais conectados aos receptores. As conseqüências de uma disfunção mitocondrial (colapso do potencial transmembrana mitocondrial interno, ruptura da cadeia respiratória, hiperprodução de ânions superóxido, interrupção da biogênese mitocondrial, saída de cálcio e glutatona da matriz e liberação de proteínas solúveis do espaço intermembranas) acarreta uma catástrofe energética culminando na ruptura da integridade da membrana plasmática (necrose) e/ou ativação de proteases apoptogênicas específicas (caspases) por proteínas mitocondriais que escapam para o citosol (citocromo c, fator indutor de apoptose) com ativação secundária de endonucleases (apoptose) (KROEMER et al., 1998). O citocromo c e o fator indutor de apoptose parecem migrar da mitocôndria para o citosol antes que os sinais da apoptose sejam observados. As pro-caspases mitocondriais 9, 3 e 2, quando liberadas no citosol e clivadas, agem como proteases aspartato-específicas que iniciam a cascada apoptótica (KOWALTOWSKI, 1997).

A alta similaridade entre a mitocôndria humana e a de levedura permite o estudo funcional genômico utilizando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* para identificar genes humanos envolvidos em doença. Cerca de 102 desordens hereditárias têm sido atribuídas à defeitos em um quarto das proteínas mitocondriais codificadas no núcleo de humanos. Apenas 40-60% (no total, 466 genes nos quais deleções implicavam em respiração mitocondrial prejudicada, sendo 265 novos) das presumidas 700-1.000 proteínas envolvidas na função mitocondrial e biogênese foram identificadas (STEINMETZ et al., 2002).

As atividades mitocondriais alternativas, além da síntese de ATP, são importantes fatores na fisiologia celular, podendo decidir sobrevivência e morte celular. Entre estas

temos o papel da mitocôndria na síntese e exportação dos centros Fe/S que são elementos estruturais e catalíticos de importância para muitas enzimas celulares mitocondriais ou citoplasmáticas (LILL; KISPAL, 2000). O conhecimento adicional a respeito destas atividades mitocondriais alternativas contribuirá para o desenvolvimento de drogas com alvo mitocondrial mais eficientes (KOWALTOWSKI, 1997).

1.3 – "Data mining"

O "data mining", busca sistemática ou "mineração" de dados, refere-se ao processo de extração de informação interessante, implícita, previamente desconhecida e potencialmente útil, aqui aplicada à análise genômica (WANG et al., 1999)

Por prover algoritmos, base de dados, interfaces do usuário e ferramentas estatísticas, a bioinformática torna possível comparar seqüências de DNA e gerar resultados potencialmente muito úteis. A comparação de seqüências é possivelmente a ferramenta computacional mais importante para os biólogos computacionais. A identificação de seqüências homólogas provê uma base para análise filogenética e o reconhecimento de seqüências-modelo. O BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL *et al.*, 1997) é utilizado para comparar uma seqüência de DNA ou de proteína incerta ou desconhecida à uma base de dados de seqüências. Localiza curtas regiões de homologia num par de longas seqüências. O conceito básico de seleção de um alinhamento ótimo de seqüências é simples. As duas seqüências são emparelhadas de maneira arbitrária. A qualidade do emparelhamento é avaliada. Então uma seqüência é movida em relação à outra e o emparelhamento é comparado novamente, até que o melhor Score de alinhamento seja encontrado (GIBAS; JAMBECK, 2001).

Num alinhamento, a identidade de seqüência refere-se à ocorrência da mesma base entre cadeias de ácidos nucléicos ou do mesmo aminoácido (entre seqüências de proteínas) na mesma posição em dois alinhamentos de seqüências. A similaridade de seqüência é significativa apenas quando possíveis substituições são avaliadas de acordo com a probabilidade com a qual elas ocorrem. Homologia de seqüências é um termo que indicaria um parentesco entre seqüências. Refere-se à relação evolucionária entre as seqüências, por compartilharem um ancestral comum (GIBAS; JAMBECK, 2001). Segundo Baxevanis e Ouellette (1998), o "E-value" descreve a probabilidade que uma seqüência com um "Score" similar irá ocorrer na base de dados por acaso, sendo calculado com a introdução de vários parâmetros.

O NCBI, em cooperação com outras organizações internacionais, provê a mais completa coleção de seqüências de DNA no mundo, podendo ser consultado pelo portal <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. O NCBI mantém dados de seqüências de vários organismos e tipos de DNA genômico, mRNA, clones de cDNA, etiquetas de seqüência expressa (ESTs) e GSS – "genome survey sequence". Cada item do GenBank® contém alguma anotação – informação sobre a identidade do gene, cDNA ou segmento gênico, as condições nas quais ele foi caracterizado, entre outras – e sua seqüência (GIBAS; JAMBECK, 2001).

A identificação de elementos funcionais codificados num genoma é um dos principais desafios da biologia moderna (PATTERSON et al. 2003). Após este passo, a fase seguinte é a catalogação, caracterização e compreensão dos elementos funcionais codificados nos genomas. Comparação de seqüências genômicas de espécies evolucionariamente diversas apresenta-se como uma poderosa ferramenta para a identificação de elementos genômicos funcionalmente importantes. Análises iniciais de seqüências genômicas disponíveis de vertebrados revelou muitas seqüências protéicas codificantes ainda não descobertas. A análise comparativa de seqüências tem facilitado a descoberta de genes codificadores de proteínas, mas tem sido de aplicação mais difícil na identificação de outros tipos de seqüências, tais como elementos regulatórios promotores, genes de RNA não-codificadores de proteínas e genes codificadores de proteínas muito pequenas. As seqüências funcionais freqüentemente podem ser reconhecidas pela sua conservação entre diferentes organismos (CLIFTEN et al. 2001).

Comparações de seqüências de mamíferos no entanto têm revelado grande número de similaridades em regiões não-codificantes, das quais poucas podem ser definidas em termos funcionais. Comparações adicionais de seqüências derivadas de múltiplas espécies, especialmente aquelas ocupando posições evolucionárias distintas, aumentará o entendimento da importância funcional de seqüências conservadas (COLLINS et al. 2003). Recentemente descobriu-se que elementos importantes residem em regiões intergênicas anteriormente consideradas "junk DNA" e hoje inclusive alguns diriam que nestas regiões existe o equivalente genômico da matéria escura encontrada no universo. O estudo de Nobrega et al.(2003) comparando regiões adjacentes ao gene DACH de humanos e de

camundongo, rã, peixe zebra, entre outros organismos revelou indicações da existência de "enhancers" conservados após mais de 1 bilhão de anos de evolução. Os "desertos gênicos" adjacentes aos genes certamente encerram importantes elementos regulatórios e a tecnologia para encontrá-los depende fundamentalmente da bioinformática. A bioinformática também fornece as ferramentas necessárias para a cada vez mais complexa análise dos genomas complexos como o humano: hoje sabemos que nos seus mais de 3 bilhões de pares de bases, cerca de 45% seriam derivados de retrotransposição de seqüências de RNA, o processamento alternativo ("alternative splicing") de genes com introns pode chegar a 60% destes genes, até 20% dos genes teriam transcrição "anti-sense", cerca de 7% dos cDNAs completos são não codificantes em universo de cerca de 25.000 genes, o único número cuja estimativa foi reduzida (HERBERT, 2004).

Características comuns de dois organismos será geralmente codificada dentro do DNA que é conservado entre as espécies. Seqüências de DNA codificantes para proteínas e RNAs responsáveis por funções que são conservadas desde o último ancestral comum deveria ser preservada em seqüências genômicas contemporâneas. Seqüências de DNA que controlam a expressão de genes que são regulados em duas espécies relacionadas também deveriam ser conservados. Ao contrário, seqüências que codificam ou controlam a expressão de proteínas e RNAs responsáveis por diferenças entre espécies serão por si próprias divergentes (HARDISON, 2003).

A comparação de propriedades genômicas de diferentes organismos é de fundamental importância no estudo de princípios evolutivos e biológicos. Embora diferenças entre organismos são geralmente atribuídas à expressão gênica diferencial, a análise comparativa global dos genomas tem sido baseada primariamente na informação de seqüência genômica. Com o rápido aumento no número de genomas seqüenciados, a determinação da função provável para ORFs ("open reading frames") identificadas em organismo recém seqüenciado ou anotação, tornou-se um importante desafio computacional. Em relação às limitações da comparação de seqüências, uma ORF pode ter vários homólogos próximos, alguns dos quais podem estar relacionados à diferentes funções. Ademais, a seqüência de uma ORF pode ter divergido, embora o gene tivesse mantido sua função (BERGMANN et al. 2003).

A dificuldade em se decifrar a anatomia dos genes é devida a vários fatores, incluindo grandes quantidades de seqüências não-codificantes, a imperfeição de algoritmos de predição gênica e seqüências de cDNA incompletas, muitas das quais consistindo de segmentos de tamanho e qualidade variável. Seqüências de cDNA completos ("full-length") são ideais para a determinação da estrutura dos genes (STRAUSBERG, et al., 2002).

De acordo com Brachat et al. (2003), o genoma de *Saccharomyces cerevisiae* é considerado um dos genomas de eucariotos mais acuradamente sequenciados e anotados. O sequenciamento genômico completo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi realizado em 1996, tornando-se o primeiro organismo nucleado a ter seu genoma inteiramente sequenciado (GOFFEAU et al., 1996), servindo como base para o sequenciamento, anotação e análise de outros grandes genomas (OSHIRO et al., 2001).

Manzella *et al.* (1998), Barros e Nóbrega (1999) foram uns dos primeiros a isolar genes de levedura de função essencial e que nada tinham a ver com a maquinaria de importação de proteínas, os quais se revelaram parte da via de transporte eletrônico que tem como uma de suas funções a síntese de centros Fe/S (LILL ; KISPAL, 2000).

No laboratório temos estudos de "data mining" acompanhado de sequenciamento dos cDNAs completos e estudo funcional heterólogo em *Saccharomyces cerevisiae* para os genes nucleares de PB relacionados à citocromo oxidase (COX) feito por Simone C. B. Bandeira; relacionados à ATPase mitochondrial por Tatiana de Moura Pereira e relacionados ao complexo III ou ubiquinol-citocromo c redutase por Julio Cesar Moreira.

Quase 500 genes de levedura têm seus produtos gênicos localizados na mitocôndria, na extensa avaliação feita já em 2001, como se pode verificar na "Yeast Proteome Database" (CONSTANZO et al., 2001; www.proteome.com/databases/index.html) e é possível construir ou obter inativação individual destes genes que vão geralmente exibir fenótipo característico (este portal que era excelente e de uso público foi comercializado e em 2002 exigia assinatura anual para acesso). Estes mutantes vão atuar como receptores de DNA clonado (cDNA) em vetores apropriados para identificação de clones capazes de restaurar o fenótipo selvagem.

A presente proposta de trabalho de mestrado buscou a realização do “data mining” dos genes de PB relacionados às funções mitocondriais como um passo para melhor compreender a função desta organela neste patógeno. Neste projeto pretendemos avançar na compreensão dos genes necessários para a função e biogênese da mitocôndria identificando genes nucleares de PB relacionados à atividade respiratória. Estes genes codificam proteínas que são sintetizadas no citoplasma, porém, exercem suas funções estruturais ou catalíticas na mitocôndria. Mais de 90% das proteínas existentes na organela são codificadas no DNA nuclear e o restante é codificado, transcrito e traduzido no interior da organela (TZAGOLOFF, 1977). Os genes codificados no genoma mitocondrial foram estudados em nosso laboratório (M.A.G. Cardoso e col.) sendo tema de tese de doutoramento.

Este trabalho tem como objetivos varrer o banco de dados denominado ALLBANK mantido em nosso laboratório (curador, Prof. Diógenes C.D. Ribeiro) contendo seqüências nucleotídicas de PB, usando um algoritmo de busca de similaridade para identificar os genes putativos candidatos a serem homólogos dos genes de *S. cerevisiae* e *Homo sapiens* relacionados às funções da mitocôndria e analisar cuidadosamente as seqüências encontradas quanto à extensão e posicionamento dos alinhamentos, número de identidades e similaridades, valor do “Score” e de E-value, anotando os possíveis cDNAs que aparentemente trazem o gene completo ("full-length cDNAs"). Além disso, busca-se tabular e analisar os dados categorizando as diversas funções identificadas, verificando também a abundância relativa dos transcritos pela freqüência de clones de cDNA existentes para o mesmo.

O sequenciamento do genoma mitocondrial de outros organismos filogeneticamente mais próximos e relacionados ao *Paracoccidioides brasiliensis* e a comparação destes poderá futuramente levar a maior esclarecimento de prováveis funções da maioria das seqüências gênicas do fungo em questão, inclusive aquelas que não apresentaram similaridade (E-value $\leq 10^{-5}$) em comparação aos genomas mitocondriais humanos e de levedura.

2 - Material e métodos

2.1 – Construção das bibliotecas

“Etiquetas de seqüências expressas” ou ESTs (“Expressed Sequence Tags”) foram gerados a partir de mRNA preparado na fase leveduriforme de PB. Os clones são orientados e clonados no vetor pCMVSPORT6 da Invitrogen e os clones individuais (cerca de 10.000) foram armazenados em placas de 96 poços (projeto colaborativo entre a UNIVAP e a Universidade de São Paulo, a Universidade Federal de São Paulo e a Universidade de Mogi das Cruzes. Este trabalho foi publicado recentemente (GOLDMAN et al., 2003). A busca de dados se deu também sobre dados ainda não publicados de um projeto de RST ("random sequence tags") genômico de *Paracoccidioides brasiliensis* no qual geramos, após agrupar os "reads" semelhantes utilizando o programa CAP3, um total de 6.645 novas seqüências.

2.2 – Preparação de DNA / sequenciamento

As minipreparações de DNA para o sequenciamento foram feitas segundo Marra *et al.* (1999) também denominado “boiling prep” assim como pelo método de filtração (protocolo utilizado no projeto cana-de-açúcar) que é essencialmente o método de Birnboim da lise alcalina (BIRNBOIM, 1983) utilizando filtros Millipore (MultiScreen MAGVN2250) montados em placas de 96 poços para reter o precipitado substituindo a etapa de centrifugação. Outras manipulações com DNA seguem protocolos estabelecidos (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

As reações de sequenciamento seguem o procedimento recomendado pela Applied Biosystems para o uso de conjunto para “cycle sequencing” denominado “BigDye Terminator” para seqüenciadores por detecção da fluorescência do didesoxinucleotídeo que termina as cadeias de DNA linearmente amplificadas no processo. As amostras são

seqüenciadas em aparelho ABI 377 de 96 canais (gel em placa) ou atualmente em aparelho ABI 3100 de 16 capilares.

2.3 – Varredura dos bancos de dados

As buscas utilizaram o programa BLASTX ("Basic Local Alignment Search Tool") (ALTSCHUL, 1997) para identificar, a partir do banco de seqüências de *Paracoccidioides brasiliensis* (traduzido nas 6 fases de leitura) as seqüências de proteínas de levedura e humanas com alta similaridade, ou seja, com E-value $\leq 10^{-5}$. Esta busca se deu contra 984 seqüências de proteínas de *Homo sapiens* e 787 seqüências de proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando-se 15.314 seqüências de *Paracoccidioides brasiliensis*, depositadas no banco de seqüências privado (gerenciado por pesquisadores das quatro universidades acima mencionadas e apoiado pela FAPESP via projeto temático 02/08711-9, coordenado pelo Dr. Gustavo H. Goldman) denominado ALLBANK. O ALLBANK é um banco de dados contendo atualmente 15.314 seqüências, sendo 3.982 EST's do trabalho desenvolvido pelo grupo de Brasília (FELIPE et al., 2003), 7.916 seqüências únicas "singlets" (constituídas de 3.295 EST's e 4.621 RST's) e 3.421 contigs (sendo 1.392 EST's e 2.024 RST's) seqüenciados pelo Laboratório de Genética e Genomas da UNIVAP, Laboratório de Biologia Molecular da USP de Ribeirão Preto, Universidade de Mogi das Cruzes e Universidade Federal de Brasília. Na descrição do nome das seqüências, os contigs são identificados pelas letras CC (exemplo: EST-PbCC001), os singlets pelas letras CS (exemplo: RST-PbCS0001). Como parâmetro para as buscas utilizamos a matriz BLOSUM62 e "E-value" $\leq 10^{-5}$.

A base de dados de proteínas de levedura foi construída utilizando-se 479 seqüências relacionadas à função mitocondrial disponíveis no Yeast Proteome Database (COSTANZO et al., 2001) e complementadas por 308 seqüências, ambas em formato FASTA, colhidas mais recentemente (junho/2003) e pertencentes à lista de genes cuja inativação resulta em fenótipo deficiente respiratório no portal da SGD (*Saccharomyces* Genome Database, <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>).

As 466 seqüências gênicas humanas relacionadas à respiração mitocondrial identificadas por inativação gênica específica serviram para identificar proteínas humanas relacionadas e foram gentilmente cedidas por STEINMETZ et al. (2002). As mesmas foram complementadas por seqüências de função mitocondrial humana disponíveis no portal www.mitoproteome.org (com atualização em junho/2003), com remoção das repetições, totalizando 984 seqüências em formato FASTA.

Desta maneira o proteoma mitocondrial de *Sacharomyces cerevisiae* e o proteoma mitocondrial de *Homo sapiens* foi comparado com as seqüências traduzidas de *Paracoccidioides brasiliensis*. Ambos os grupos de seqüências foram comparados separadamente, através do BLASTX, utilizando-se como parâmetros E-value $\leq 10^{-5}$ contra as 15.319 seqüências nucleotídicas de *P. brasiliensis*. Esta busca foi feita em nosso servidor utilizando BLAST residente e as bases de dados mencionadas.

2.4 – Apresentação do resultados (Tabela 3):

A partir dos resultados das buscas realizadas, foi construída uma tabela (TABELA 3, disponível no portal: http://200.136.178.19/web_g/DrNobrega.htm) com informações sobre todos os pareamentos encontrados com os parâmetros selecionados: nome e quantidade de nucleotídeos ("Length") das seqüências de *Homo sapiens* e de *Saccharomyces cerevisiae* ("Subjects") que obtiveram valores de E-value $\leq 10^{-5}$, os respectivos clusters de PB ("Query") e as quantidades de aminoácidos ("Letters"), as posições ("Alignment Q/S"), valores de Identidade, "Score" e "E-value" de alinhamentos entre as seqüências "Query" e a "Subject", as descrições das Funções e Processos de cada seqüência humana ou de levedura encontrada segundo a classificação do G.O. ("Gene Ontology"), a Classificação em Categorias Funcionais da seqüência com maior valor de "Score/E-value" no pareamento com PB, o nome da seqüência e do respectivo organismo à qual esta pertence encontrada no pareamento com o banco de dados nr do GenBank®, seu comprimento em nucleotídeos ("Length") e os respectivos valores de "Score" e "E-value" do pareamento com seqüências de PB.

A descrição das funções e processos moleculares de cada seqüência protéica humana encontrada por similaridade com seqüências de PB foi retirada do "NCBI Sequence Viewer" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>), para facilitar a descrição funcional. Já a descrição dos genes de levedura encontrados foi retirada por busca no portal da S.G.D. (Saccharomyces Genome Database, <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>). Ambos os bancos de dados utilizam anotações gênicas baseadas na base de dados G.O. (Gene OntologyTM Consortium - <http://www.geneontology.org/>), que fornece uma designação diferenciada que pode ser aplicada a todos os organismos para uniformizar o conhecimento e descrição dos papéis dos genes e proteínas nas células.

A classificação funcional das seqüências de PB encontradas através das similaridades com seqüências humanas e de levedura foi feita utilizando 11 categorias funcionais, de acordo com a classificação proposta (função primária) no portal www.mitoproteome.org: (COTTER et al., 2004)

- 1) Crescimento / divisão celular
- 2) Defesa / morte / envelhecimento celular
- 3) Transporte / mecanismos de transporte celular
- 4) Síntese de proteínas / DNA / RNA
- 5) Energia
- 6) Metabolismo
- 7) Protease
- 8) Endereçamento protéico
- 9) Sinalização
- 10) Função estrutural
- 11) Desconhecido / outros

Para identificação das prováveis seqüências "full-length" (cDNAs completos), foi utilizado o critério adotado por FONSECA et al. (2001), de que "as seqüências devem ter não mais que 30 aminoácidos da extremidade N-terminal fora do alinhamento com a

proteína de referência e espaço suficiente para acomodar a seqüência de nucleotídeos divergentes na extremidade 5' do agrupamento de ESTs”.

A partir das seqüências de PB selecionadas por similaridade com proteínas humanas e de levedura, realizou-se uma nova busca utilizando-se a ferramenta BLASTX (que compara uma seqüência de nucleotídeos traduzida em todas as fases de leitura contra uma base de dados de seqüências protéicas) (PERTSEMLIDIS.; FONDON, 2001) para o pareamento contra seqüências do banco de dados nr (não-redundante) do GenBank® - atualizado em 28/07/2003 via Internet. Tais buscas foram realizadas para encontrar as proteínas com maior similaridade aos genes traduzidos de PB existentes entre todas as seqüências e organismos registrados no GenBank® e eventualmente fornecer dados adicionais para a anotação das funções apontadas para estas seqüências.

3 – Resultados

A análise das seqüências nucleotídicas de *P. brasiliensis* comparadas às seqüências protéicas humanas e de levedura relacionadas à função mitocondrial revelou resultados com similaridade bastante significativa. Os resultados com alinhamentos válidos foram preparados utilizando um algoritmo de busca e validação desenvolvido por Diógenes C.D. Ribeiro para este estudo, permitindo o "data-mining" das informações com maior velocidade. As seqüências humanas permitiram identificar 1.027 hits contra PB e as de levedura 1.107 seqüências de PB com valor de E-value $\leq 10^{-5}$. Com diferentes seqüências de PB puderam ser identificadas, em alguns casos, a mesma proteína humana e de levedura.

Das 15.319 seqüências de PB depositadas no ALLBANK, apenas 1.569 (10,24 %) obtiveram alinhamentos significativos contra as seqüências selecionadas humanas e/ou de levedura.

Das seqüências de PB que alinharam contra as proteínas de referência 485 apresntaram similaridade apenas com as seqüências humanas e 532 apresentaram similaridade apenas com seqüências de levedura. Cerca de 552 seqüências de PB revelaram alinhamentos significativos tanto com seqüências humanas quanto com seqüências de levedura. Cerca de 13.750 (89,76 %) seqüências de PB não mostraram similaridade com nenhuma das seqüências do proteoma humano ou de levedura.

Entre os clones de PB considerados prováveis "full-length", identificamos um total de 459 genes (ou seja, 29,3 % do total de seqüências selecionadas), 161 (10,3 %) correspondem às seqüências alinhadas apenas com as seqüências humanas, 194 (12,4 %) correspondem às seqüências alinhadas apenas com as seqüências de levedura e 104 (6,6 %) correspondem às seqüências alinhadas tanto com seqüências de levedura quanto com seqüências humanas.

Em relação à classificação funcional das seqüências identificadas e sua distribuição nas diferentes categorias (FIGURA 1), encontramos:

1) Crescimento / divisão celular	46	(3 %)
2) Defesa / morte / envelhecimento celular	68	(4 %)

3) Transporte / mecanismos de transporte celular	123	(3 %)
4) Síntese de proteínas / DNA / RNA	97	(6 %)
5) Energia	277	(18 %)
6) Metabolismo	420	(27 %)
7) Protease	89	(6 %)
8) Endereçamento protéico	23	(1 %)
9) Sinalização	48	(3 %)
10) Função estrutural	17	(1 %)
11) Desconhecido / outros	361	(23 %)

Pertencente à Classificação Funcional 1 (Crescimento e divisão celular), foram encontrados principalmente similaridade com proteínas de levedura, relacionadas à esporulação (SPS2), crescimento de pseudohifas (DIA4), crescimento por brotamento (GIN4, SAC6), biogênese da parede celular (SSD1), proteínas quinase responsáveis pela proliferação celular (ADK1, PHO85), proteínas responsáveis pela recombinação meiótica (MLH1) e proteínas com função na organização, biogênese, herança e manutenção mitocondrial (MDM10).

Dentro da Classificação Funcional 2 (Defesa, morte e envelhecimento celular), foram observados pareamentos significativos tanto com proteínas de leveduras quanto com proteínas humanas. Algumas proteínas de choque térmico (HSP5, HSP54, HSP60, HSP70, HSP78 e HSP90), proteínas responsáveis pela manutenção do genoma mitocondrial (RIM1, MDV1) e proteínas reguladoras da apoptose e fissão mitocondrial (MitoID22-20631967, DNM1) foram aqui classificadas. Em relação às proteínas sintetizadas frente às condições de estresse osmótico ou oxidativo, foram encontrados similaridade com GRX5, RVS167, MitoID409-4557014 (catalase), MitoID404-13631440 (proteína anti-oxidante tiol-específica). Dentre as proteínas detoxificadoras, foram observadas MitoID740-5803181, MitoID391-121665 (glutathione peroxidase), MitoID412-6912238 (peroxiredoxina), MitoID399-10835189 (glutathione reductase) e SOD2 (superóxido dismutase, também encontrada em vários pareamentos contra proteínas humanas).

Inseridos na Classificação 3 (Transporte e mecanismos de transporte celular) encontram-se proteínas de canais iônicos dependentes de voltagem (GEF1, POR1), proteínas transportadoras de aminoácidos (DIP5, ORT1), proteínas transportadoras ABC - ou ATP-binding cassette - (MitoID57-6005804, MitoID56-609360, MDL2, ATM1, MitoID58-9955963), proteínas transportadoras de hidrogênio (CUP5, VMA8, VMA5, VMA4, VMA2), translocases ADP/ATP (PET9, MIR1), proteínas transportadoras atuantes no retículo endoplasmático, complexo de Golgi, endossomo ou vacúolo (GLO3, PEP3, BRO1, SNF7, PEP7, VPS20, VPS24, VPS45), transportadores de potássio (KHA1), ferro (SPE3, ATX1), cobalto e zinco (COT1), cobre (CCC2) e outros transportadores diversos mitocondriais (YGR096W, YNL083W, YMC1, KAP123).

Proteínas relacionadas à Classificação Funcional 4 (Síntese de proteínas/RNA/DNA) correspondem a proteínas responsáveis pela transcrição do DNA (MIG3, MTF1) e replicação do DNA (RNR4), entre proteínas responsáveis pela síntese de proteínas temos proteínas ribossomais entre outras (MitoID220-11056056, MitoID196-8922794, MRPS8, MRPS16, MRPS17, RPL1B, MRPL51, RSM22, IMG2, MitoID162-7706057, MitoID160-7705626), proteínas promotoras da transcrição da RNA polimerase II (CAT8, SSN3, SNF2, SNF5, HCM1, ARP9), helicases (MSS116, YDR332W), triptofanil tRNA sintetase 2 (MitoID150-7710154), tetrahidrofolilpoliglutamato sintetase, e proteínas responsáveis pela biossíntese do ergosterol (ERG3, ERG24), da biotina (BIO2), da fosfatidilcolina (PSD1), etc. Como já esperado, devido ao fato da mitocôndria ser a organela responsável primordialmente pela geração de energia celular, encontramos muitos genes dentro da classificação funcional 5 (Energia).

Curiosamente encontramos várias enzimas relacionadas à glicólise que é uma via sabidamente citoplasmática. Isto deve ser devido à identificação por técnicas de espectroscopia de massa do proteoma de mitocôndrias purificadas (Taylor et al., 2003) o arrasta proteínas abundantes da célula talvez sem um significado de associação funcional com a organela. Em relação às primeiras etapas da geração energética (glicólise e catabolismo das hexoses), encontramos:

- MitoID536-7669492 * (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, responsável pela oxidação do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato);
- MitoID532-4507645 * (triosefosfato isomerase, responsável pela interconversão das trioses fosfato);
- MitoID529-107554 e MitoID773-4505689* (piruvato quinase, que na última etapa da glicólise catalisa a transferência do grupo fosfato do fosfoenolpiruvato para o ADP);
- MDH1, MitoID450-6648067 (malato desidrogenase, que reduz oxalacetato a malato)

Várias proteínas que participam do ciclo do ácido cítrico foram encontradas:

- LAT1 (subunidade da piruvato desidrogenase, que participa da conversão do piruvato à acetil-CoA);
- MitoID451-4758076 (citrato sintase, enzima catalizadora de reações de condensação para a formação de citrato);
- MitoID437-4103446 (isocitrato desidrogenase β , que realiza a oxidação do isocitrato à alfa-cetoglutarato e CO_2);
- MitoID447-3766197 (succinil CoA sintetase, que transforma o succinil-CoA em succinato);
- SDH1, SDH4 (succinato desidrogenase, que oxida o succinato a fumarato);
- MitoID511-4505627 (piruvato carboxilase, que catalisa a carboxilação reversível do piruvato por CO_2 para formar oxalacetato).

Na levedura, o acetato pode servir tanto como um combustível rico em energia quanto como uma fonte de fosfoenolpiruvato para a síntese de carboidratos. Esses organismos possuem uma via, o ciclo do glioxalato, que permite a conversão líquida do acetato em oxalacetato. Nesta via encontramos a MLS1 (malato sintase, que catalisa a condensação do glioxalato com acetil-CoA para formar malato)

A fosforilação oxidativa é o processo que ocorre nas bactérias e nas mitocôndrias no qual a formação de ATP é obtida pela transferência de elétrons de moléculas oriundas de alimentos a oxigênio molecular. Algumas proteínas que participam deste processo foram encontradas nas buscas realizadas:

- MitoID280-14149625, MitoID288-6274550 (NADH desidrogenase, pertencente ao Complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondriais);
- COR1, CYT1 (ubiquinona-citocromo c redutase, pertencente ao Complexo III da cadeia transportadora de elétrons mitocondriais);
- COX1, COX6, COX9, COX16, COX17 (citocromo oxidase, pertencente ao Complexo IV da cadeia de transferência de elétrons mitocondriais).

Dentre as ATP sintases, responsáveis pelo transporte de prótons para a geração de energia, identificamos sete subunidades desta enzima. Outras proteínas com funções relacionadas à ATP sintase foram a MSP1 e a YTA12.

Referente à oxidação de ácidos graxos, foram encontradas algumas proteínas:

A proteína HFA1 encontrada possui funções na biossíntese de lipídeos, atuando como acetil-CoA carboxilase, que forma malonil-CoA a partir do acetil-CoA.

- MitoID577-4501859 (acil-CoA desidrogenase, presente no primeiro passo da β -oxidação)

A Classificação Funcional 6 refere-se à processos gerais de metabolismo. Dentre todos os pareamentos realizados através da ferramenta BLAST, a proteína mais freqüentemente encontrada nos resultados de maior "Score/E-value" foi a LIP5, da *S. cerevisiae*, que atua no metabolismo de ácidos graxos (função também compartilhada pelas proteínas MitoID581-11276083 (CoA ligase II) e PDX3. Foram encontrados pareamentos com proteínas responsáveis pela metabolismo de compostos de 1 carbono (GCV1, GCV2, GCV3), metabolismo da carnitina (YAT1), do ubiquinol (COQ3, COQ4), do glutamato e do nitrogênio (MitoID476-4504069, AAT2), do propionato (ICL2), do DNA e do RNA (NUC1), do malato e do piruvato (MitoID504-5729920), do aminobutirato (MitoID480-4501847) e da arginina (MitoID454-4502215). Proteínas com função de aldeído desidrogenase (ALD4, MitoID569-11095441, MitoID506-4502043, MitoID509-105247, MitoID234-13630862, MitoID505-4502041) e álcool desidrogenase (ADH3), apesar de também poderem ser classificados na Classificação Funcional 5, foram aqui descritos por metabolizar aldeídos e álcoois.

Várias proteases (Classificação Funcional 7) foram encontradas nas buscas, entre elas proteases ubiquitina-específicas (DOA4, UBC11, MitoID3-4507793, MitoID729-

11024714), peptidases ATP-dependentes (PIM1), catepsinas (MitoID679-4503143) e outras proteínas com função de proteólise e peptidólise, tais como a “saccharolisina” (PRD1), a YTA12 e a MitoID677-5174419. A importância desta categoria é crescente, com o reconhecimento da importância da proteólise para remover os resíduos da "turnover" usual de proteínas e na destruição de proteínas com defeito ou que não se associaram corretamente aos complexos multienzimáticos da organela. Estas atividades, se perturbadas parecem estar na origem de várias doenças degenerativas.

A Classificação Funcional 8, referente ao Endereçamento protéico, acaba por ser sinônimo de uma série de outras funções, basicamente associadas ao endereçamento de proteínas dentro da célula, como exemplo, temos a YDJ1, que é uma proteína com destino mitocondrial responsável pela regulação Hsp70/Hsc70. Como exemplos de pareamentos relacionados à Função 8, temos a DID4 e a STP22 (transporte endossomo para vacúolo e endereçamento proteína para vacúolo ou membrana), a MitoID587-4502327 (proteína de ligação ao RNA-AU), MitoID744-16157111 (proteína de ligação à progesterona) e a NIP100 (proteína de ligação aos microtúbulos), várias proteínas transportadoras situadas na membrana interna (TIM 9, TIM17, TIM22, TIM23, TIM40, TIM54, MitoID726-7662673), e proteínas transportadoras da membrana externa (TOM20, TOM22, TOM40, TOM70) que atuam conjuntamente para constituir o poro especializado que importa a maioria das proteínas sintetizadas no citoplasma para dentro da mitocôndria.

Classificadas como proteínas de sinalização (Classificação Funcional 9), foram encontradas proteínas RAS transdutoras de sinais (IRA2, RAP1B), proteína transdutora de sinais ligada à guanina (proteína G subunidade beta-4: MitoID757-11055998), proteína transdutora de sinais ligada ao cálcio (MitoID800-6912482), proteína de alvo vacuolar, regulada pela glicose (SNF8), sinalizadores/ativadores de transcrição (HAP2, HAP5, HCM1), entre outras.

Entre as proteínas classificadas na função 10 (Função estrutural) foram encontrados similaridades significativas contra FIS1 (constituente estrutural da actina), histona H4 (MitoID847-32097) e proteínas responsáveis pela estruturação e modificação da cromatina (PHO23, HTA1).

A Classificação Funcional 11 (Desconhecida/Outras) engloba principalmente proteínas hipotéticas, de função ainda não definida, que foram encontradas com maior prevalência em pareamentos que apresentavam maior valor de "Score/E-value" contra proteínas humanas. Como exemplo temos a calnexina (MitoID119-10716563), peptidilprolilisomerase (MitoID698-5031987, CPR3), histidina decarboxilase (MitoID494-13640929), acetilCoA tiolase (MitoID657-499158), proteína inibidora da dissociação Rho GDP (MitoID756-10835002), miosina de cadeia pesada (MitoID843-14771689), tioredoxina (MitoID407-14740403), miosina ventricular (MitoID865-226007), sirtuina 3 (MitoID912-13641918), carbonil redutase (MitoID425-12804319), entre outras.

O banco de dados nr (não-redundante) do GenBank® – foi utilizado para fazer uma busca de similaridade contra as sequências nucleotídicas de PB identificadas neste trabalho. Apenas 18 sequências de PB não demonstraram pareamentos significativos contra este banco. Entre as funções gênicas descritas encontradas no pareamento com o banco nr, cerca de 665 (42,4 %) correspondem à proteínas hipotéticas, ou seja, ainda sem função definida.

Entre os organismos encontrados (TABELA 2, FIGURA 2), temos os seguintes resultados para os que apresentaram maior similaridade com os genes de PB: *Neurospora crassa* (55,77%), *Emericella nidulans* (10,4%), *Paracoccidioides brasiliensis* (4,4%), *Schizosaccharomyces pombe* (5,9%), *Aspergillus fumigatus* (2,7%), *Aspergillus niger* (2,7%), *Aspergillus nidulans* (1,93%), *Saccharomyces cerevisiae* (1,67%), *Ajellomyces capsulata* (1,35%), *Aspergillus oryzae* (1,29%), *Coccidioides immitis* (0,9%), *Podospora anserina* (0,9%), *Homo sapiens* (0,77%) e outros (9,32%). Estes números devem ser examinados com a devida cautela, pois em boa parte refletem a relativa abundância de seqüências depositadas no GenBank. A *Neurospora crassa* é o único fungo filamentoso da lista que teve seu genoma inteiramente seqüenciado recentemente (GALAGAN et al., 2003)

4 - Discussão

A identificação de elementos funcionais codificados num genoma tornou-se um dos principais desafios da era pós-sequenciamento genômico de organismos-modelo, criando oportunidades para a pesquisa básica e aplicada. A genômica comparativa é uma das armas disponíveis para tal, inferindo funções putativas e servindo como base para um futuro estudo detalhado e pesquisas dirigidas por hipóteses. Certamente a ferramenta computacional mais poderosa disponível é a busca por similaridade, que permite identificar seqüências semelhantes seja por ancestralidade, seja por duplicação gênica. Homologia significa dizer que a similaridade encontrada se deve à existência de um ancestral evolutivo comum no passado entre as espécies comparadas.

Uma vez que há relação entre o valor do "Score" e o do "E-value" de uma seqüência gênica e sua probabilidade de possuir semelhanças estruturais (estrutura terciária da proteína) e funcionais com a seqüência à qual esta foi comparada, a genômica comparativa torna-se uma poderosa ferramenta para a descoberta de novos genes. A descoberta dos genes de PB relacionados à função mitocondrial requer um exame laborioso de centenas de possíveis genes entre milhares de candidatos.

Os dados de pareamento com o banco nr ou não repetitivo (GenBank®) sugerem que *Neurospora crassa* possui razoável proximidade com PB relativamente aos organismos que forneceram a coleção de proteínas utilizadas na busca: *S. cerevisiae* e *H. sapiens*. Isto é esperado já que PB tem fase miceliana e se distancia filogeneticamente das leveduras e dos vertebrados como podemos ver pela árvore filogenética encontrada no portal do NCBI ("taxonomy"). Pareamentos com seqüências gênicas de organismos patogênicos ao homem, em especial outros fungos, poderão ser úteis na busca de genes associados à virulência e patogenicidade, tais como *Aspergillus sp.*, *Coccidioides immitis*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Tricophyton rubrum*, entre outros. Muitos destes fungos não exibiram pareamentos significativos em quantidade com o PB principalmente devido ao pequeno número de seqüências depositadas no GenBank. Projetos em andamento (como o sequenciamento de *Histoplasma capsulatum* que também é termo-dimórfico, entre outros fungos) vão permitir comparações futuras de grande utilidade. Apenas 68 seqüências de PB

identificaram proteínas do próprio *P. brasiliensis* (Tabela 2) contra este banco, devido ao fato de que apenas 145 proteínas de PB foram depositadas como tais no GenBank (ver "taxbrowser" no portal do NCBI). Também a significância de um alinhamento depende do tamanho do espaço de busca que foi examinado, "tal como a chance de se encontrar uma agulha no palheiro depende do tamanho do palheiro" (BAXEVANIS; OUELLETTE, 1998). O que pode significar que certas seqüências não aparecem nesta busca por esta razão.

Diversas proteínas mitocondriais, como aquelas presentes no complexo NADH desidrogenase-ubiquinona que transloca prótons (o de levedura não transloca prótons, só elétrons) e outras relacionadas às atividades presentes exclusivamente em eucariotos mais complexos estão ausentes em *S. cerevisiae* (FONSECA et al., 2001), fazendo-se necessária a busca utilizando seqüências humanas como utilizamos, ou de outros organismos, com sistema mitocondrial semelhante, anotadas e disponíveis no GenBank®.

A classificação funcional das seqüências encontradas através das buscas aqui realizadas é um primeiro passo para uma visão global das funções putativas para então partir para investigações mais detalhadas da função dos genes ligados às funções mitocondriais em PB.

O conhecimento adicional a respeito das atividades mitocondriais, buscando genes potencialmente envolvidos na transição dimórfica, fatores de resistência às drogas, patologia e fatores de diferenciação de *P. brasiliensis* poderá contribuir para o desenvolvimento de drogas com alvo em funções mitocondriais. Procura-se também identificar os genes relacionados às funções mitocondriais presentes exclusivamente em *P. brasiliensis*, que podem estar ligados às suas características de patogenicidade ou sejam alvo de controle através de drogas-alvo específicas para este fungo.

Como objetivos futuros, a partir dos dados do presente trabalho, pode-se tentar a complementação funcional em levedura de vários dos cDNAs completos identificados.

A disponibilidade pública de seqüências genômicas de organismos gera novas estratégias para o mapeamento molecular funcional gênico. A genômica comparativa torna-se de imensa importância, de modo que a análise *in silico* mostra-se uma poderosa

ferramenta para o estudo inicial do potencial genético e funcional do organismo ampliando as possibilidades ao identificar alvos para estudo aprofundado seja *in vivo* ou *in vitro*.

Evidência experimental direta é requerida para a confirmação das funções das seqüências aqui identificadas. Para estudo efetivo de cada um dos possíveis genes, há várias abordagens a serem realizadas, tais como estudo de expressão gênica, estudo da localização intracelular dos produtos gênicos, tentativa de inativação ou nocaute gênicos, ensaios *in vivo*, complementação genética heteróloga em levedura ou em *N. crassa*, etc entre outras.

5 - Referências bibliográficas

ALTSCHUL S.F.; MADDEN T.L.; SCHAFFER A.A.; ZHANG J.H.; ZHANG Z.; MILLER W.; LIPMAN D.J. Gapped BLAST and PSI_BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.

ANDERSSON S.G.; ZOMORODIPOUR A.; ANDERSSON J.O.; SICHERITZ-PONTEN T.; ALSMARK U.C.; PODOWSKI R.M.; NASLUND A.K.; ERIKSSON A.S.; WINKLER H.H.; KURLAND C.G. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. **Nature**, v.396, n.6707, p.133-140, 1998.

ARISTIZABAL, B.H.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A.; RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. **Infect Immun.**, v.66, n.11, p.5587-5591, 1998. Disponível em <<http://www.iai.asm.org>>. Acesso em 30 jun. 2003.

BAGAGLI, E.; FRANCO, M.; BOSCO, S.M.; HEBELER-BARBOSA, F; TRINCA, L.A; MONTENEGRO, M.R. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med Mycol.**, v.41, n.3, p.217-223, 2003.

BAKER, K.P.; SCHATZ, G. Mitochondrial proteins essential for viability mediate protein import into yeast mitochondria. **Nature** v.349, p.205-208, 1991.

BARROS, M.H.; NÓBREGA, F.G. *YAH1* of *Saccharomyces cerevisiae*: a new essential gene that encodes for a mitochondrial protein homologous to human adrenodoxin. **Gene**, v.233:, p.197-203, 1999.

BAXEVANIS, A.D.; OUELLETTE, B.F.F. **Bioinformatics – a practical guide to the análisis of genes and proteins**. United States of America. Wiley Interscience, 1998. 370 p.

BERGMANN S, IHMELS J, BARKAL N. Similarities and differences in genome-wide expression data of six organisms. **PLoS Biology**., v.2, n.1, p.0001-9., 2003. Disponível em: <<http://biology.plos.journals.org>>. Acesso em: 20 dez. 2003.

BIRNBOIM, H.C. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. **Methods Enzymol.** v.100, p.243-255, 1983.

BLOTTA, M.H.S.L.; CAMARGO, Z.P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationships with clinical forms of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.** v.31, p.671-676, 1993.

BORGES-WALMSLEY, M.I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A.R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol**; v.10, n.2, p.80-87, 2002.

BRACHAT, S.; DIETRICH, F.S.; VOEGELI, S.; ZHANG, Z.; STUART, L.; LERCH, A.; GATES, K.; GAFFNEY, T.; PHILIPPSEN, P. Reinvestigation of the *Saccharomyces cerevisiae* genome annotation by comparison to the genome of a related fungus: *Ashbya gossypii*. **Genome Biol.**, v.4, n.7, p.45, 2003. Disponível em <<http://www.genomebiology.com>>. Acesso em 30 jun.2003.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol Rev.** v.6, n.2, p.89-117, 1993.

CANO, L.E.; SINGER-VERMES, L.M.; VAZ, C.A.; RUSSO, M.; CALICH, V.L. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression and infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infect Immun**; v.63, n.5, p.1777-83, 1995.

CLIFTEN, P.F.; HILLIER, L.W.; FULTON, L.; GRAVES, T.; MINER, T.; GISH, W.R.; WATERSON, R.H.; JONSTON, M. Surveying *Saccharomyces* genomes to identify functional elements by comparative DNA sequence analysis. **Genome Research**, v.11, n. 7, p.1175-1186, 2001. Disponível em <<http://www.genome.org/cgi/content>>. Acesso em 10 out. 2003.

COLLINS F.S.; GREEN E.D.; GUTTMACHER A.E.; GUYER M.S. A vision for the future of genomics research. **Nature**, v.24, n. 422, p.835-847, 2003.

CONSTANZO, M.C.; CRAWFORD, M.E.; HIRSCHMAN, J.E.; KRANZ, J.E.; OLSEN, P.; ROBERTSON, L.S.; SKRZYPEK, M.S.; BRAUN, B.R.; HOPKINS, K.L.; KONDU, P.; LENGIEZA, C.; LEW-SMITH, J.E.; TILLBERG, M.; GARRELS, J.I. YPDTM, PombePDTM, and WormPDTM: a model organism volumes of the BioKnowledgeTM library, an integrated resource for protein information. **Nucleic Acids Res.** v.29:, p.75-79, 2001.

COTTER, D., PURNIMA GUDA, EOIN FAHY, SHANKAR SUMBRAMANIAM. "MitoProteome: Mitochondrial Protein Sequence Database and Annotation System." **Nucleic Acids Research** v.32, p.463-467, 2004.

FEITOSA, L.S.; CISALPINO, P.S.; DOS SANTOS, M.R.; MORTARA, R.A.; BARROS, T.F.; MORAIS, F.V.; PUCCIA, R.; SILVEIRA, J.F.; DE CAMARGO, Z.P. Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol.** v.39, n.1, p.60-69, 2003.

FELIPE, MS, ANDRADE, RV, PETROFEZA, SS, MARANHÃO, AQ, TORRES, FA, ALBUQUERQUE, P., ARRAES, FB, ARRUDA, M, AZEVEDO, MO, BAPTISTA, AJ, BATAUS, LA, BORGES, CL, CAMPOS, EG, CRUZ, MR, DAHER, BS, DANTAS, A, FERREIRA, MA, GHIL, GV, JESUÍNO, RS, KYAW, CM, LEITÃO, L, MARTINS, CR, MORAES, LM, NEVES, EO, NICOLA, AM, ALVES, ES, PARENTE, JA, PEREIRA, M, POCAS-FONSECA, MJ, RESENDE, R, RIBEIRO, BM, SALDANHA, RR, SANTOS,

SC, SILVA-PEREIRA, I, SILVA, MA, SILVEIRA, E, SIMÕES, IC, SOARES, RB, SOUZA, DP, DE-SOUZA, MT; ANDRADE, EV, XAVIER, MA, VEIGA, HP, VENÂNCIO, EJ, CARVALHO, MJ, OLIVEIRA, AG, INOUE, MK, ALMEIDA, NF, WALTER, ME, SOARES, CM, BRIGIDO, MM. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *YEAST*. v..20, n.3, p.263-71. Feb. 2003.

FONSECA, G.V.; TAMBOR, J.H.M.; NOBREGA, M.; SANTOS, R.; NOBREGA, F.G. Sugarcane genes related to mitochondrial function. **Genetics and Molecular Biology**.v.24 n.1-4, p.175-181, 2001.

FRANCO, M. Host parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J. Méd. Vet. Mycol.** v.25, p.5-18, 1987.

GALAGAN J.E.; CALVO S.E.; BORKOVICH K.A.; SELKER E.U.; READ N.D.; JAFFE D.; FITZHUGH W.; MA L.J.; SMIRNOV S.; PURCELL S.; REHMAN B.; ELKINS T.; ENGELS R.; WANG S.; NIELSEN C.B.; BUTLER J.; ENDRIZZI M.; QUI D.; IANAKIEV P.; BELL-PEDERSEN D.; NELSON M.A.; WERNER-WASHBURNE M.; SELITRENNIKOFF C.P.; KINSEY J.A.; BRAUN E.L.; ZELTER A.; SCHULTE U.; KOTHE G.O.; JEDD G.; MEWES W.; STABEN C.; MARCOTTE E.; GREENBERG D.; ROY A.; FOLEY K.; NAYLOR J.; STANGE-THOMANN N.; BARRETT R.; GNERRE S.; KAMAL M.; KAMVYSSELIS M.; MAUCELI E.; BIELKE C.; RUDD S.; FRISHMAN D.; KRYSTOFOVA S.; RASMUSSEN C.; METZENBERG R.L.; PERKINS D.D.; KROKEN S.; COGONI C.; MACINO G.; CATCHESIDE D.; LI W.; PRATT R.J.; OSMANI S.A.; DESOUZA C.P.; GLASS L.; ORBACH M.J.; BERGLUND J.A.; VOELKER R.; YARDEN O.; LAMANN M.; SEILER S.; DUNLAP J.; RADFORD A.; ARAMAYO R.; NATVIG D.O.; ALEX L.A.; MANNHAUPT G.; EBBOLE D.J.; FREITAG M.; PAULSEN I.; SACHS M.S.; LANDER E.S.; NUSBAUM C.; BIRREN B. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature**, v. 422, n.6934, p.859-868, 2003.

GIBAS, C., JAMBECK, P. **Developing Bioinformatics Computer Skills**. United States of América. O'REILLY, 2001. 427 p.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B.G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R.W.; DUJON, R.W.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J.D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E.J.; MEWES, H.W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S.G. Life with 6000 genes, **Science**, v.21;n. 275, n.5303, p.1051-1052, 1996.

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.; TEKAIA, F.; NOBREGA, M.P.; NOBREGA, F.G.; GOLDMAN, M.H.S. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. **Eukaryotic Cell**, v.2, n.1, p.34-48, 2003.

GRAY, M.W.; BURGER, G.; LANG B.F. Mitochondrial evolution. **Science**. v.283, n.5407, p.1476-1481, 1999.

HARDISON R.C. Comparative Genomics. **PloS Biology**, v.1, n.2, 2003. Disponível em <<http://www.plosbiology.org/plosonline>>. Acesso em 15 dez. 2003

HEBELER-BARBOSA, F; MONTENEGRO, M.R.; BAGAGLI, E. Virulence profiles of tem *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **Med Mycol.**, v.41, n.2, p.89-96, 2003.

HERBERT, A. The four Rs of RNA-directed evolution. **Nature Genetics**, v.36, p.19-25, 2004

IZACC, S.M.S.; GOMEZ, F.J.; FONSECA, C.A.; FELIPE, M.S.S.; DEEPE, G.S.; SOARES, C.M.A. Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**. v. 39, p.445-455, 2001.

JESUINO, R.S.A.; AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M.S.S.; PEREIRA, M.; SOARES, C.M.A. May 2002 Characterization of a chaperone Clpb homologue of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Yeast**. v.19, p.000-000, DOI:10.1002/yea.888. Disponível em <www.interscience.wiley.com> . Acesso em dez 2002.

KOWALTOWSKI, A. J. Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production. **Bras J Med Biol Res.**, v.33, n.2, p.241-250, 2000.

KROEMER, G.; DALLAPORTA, B.; RESCHE-RIGON, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. **Annu Rev Physiol**. v.60, p.619-642, 1998.

LACAZ, C.S. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent. In FRANCO, M., LACAZ, C.S., RESTREPO-MORENO, A., DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. CRC Press , p. 1-11, 1994.

LANG B.F.; BURGER G.; O'KELLY C.J.; CEDERGREN R.; BRIAN GOLDING G.; LEMIEUX C. et al. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. **Nature**, v.387, p.493-497, 1997.

LILL, R.; KISPAL, G. Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria **TIBS**. v.25:, p.352-356, 2000.

LOPEZ-GARCIA, P.; MOREIRA, D. Metabolic symbiosis at the origin of eukaryotes. **Trends Biochem. Sci.**, v.24, n.3, p.88-93, 1999.

MANZELLA, L., BARROS, M.H., NOBREGA, F.G. *ARH1* of *Saccharomyces cerevisiae*: a new essential gene that encodes for a protein homologous to the human adrenodoxin reductase, **Yeast**. v.14, p.839-846, 1998.

MARGULIS, L. **Origin of Eukaryotic cells**. New Heaven: Yale Univ. Pres, 1970.

MARRA, M.A.; KUCABA, T.A.; HILLIER, L.W.; WATERSTON, R.H. High-throughput plasmid DNA purification for 3 cents pre sample. **Nu. Ac. Res**. v.27; p.37, 1999.

MARTIN, W.; MULLER, M. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. **Nature**, v.392, p.37-41, 1998.

MATTHEWS, R.C.; MARESCA, B.; BURNIE, J.P.; CARDONA, A.; CARRATU, L.; CONTI, S.; DEEPE, G.S.; FLOREZ, A.M.; FRANCESCHELLI, S.; GARCIA, E.; GARGANO, L.S.; KOBAYASHI, G.S.; MCEWEN, J.G.; ORTIZ, B.L.; OVIEDO, A.M.; POLONELLI, L.; PONTON, J.; RESTREPOS, A.; STORLAZZI, A. Stress proteins in fungal diseases. **J Med Mycol**. v.36 Suppl 1, p.45-51, 1998.

MAZUR, P., MORIN, N., BAGINSKY, W., EL-SHERBEINI, M., CLEMAS, J.A., NIELSEN, J.B., FOOR, F. Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3- β -D-glucan synthase. **Mol Cell Biol** v. 15, p.5671-5681.1995.

MCEWEN, J.G.; TAYLOR, J.W.; XU, J.; FELIPE, M.S.S.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T.G.; KASUGA, T.; WHITE, T.; BUI, T.; SOARES, C.M.A. Molecular typing of pathogenic fungi. **Mol Cell Biol**. v..38, Supplement I, p.189-197.

MORAIS, F.V.; BARROS, T.F.; FUKADA, M.K.; CISALPINO, P.S.; PUCCIA, R. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol**; v.38, n.11, p.3960-3966, 2000.

MEDOFF, G.; PAINTER, A.; KOBAYASHI, G.S. Mycelial-to-yeast-phase transitions of the dimorphic fungi *Blastomyces dermatitis* and *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Bacteriology**. v.169, p.4055-4060, 1987.

MIYAJI, M., SANO, A., SHARMIN, S., KAMEI, K., NISHIMURA, K. The role of chlamydospores of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Jpn. J. Med. Mycol.**, Vol. 44, p.133-138, 2003.

MOTOYAMA, A B.; VENANCIO, E.J.; BRANDÃO, G.O.; PETROFEZA-SILVA, S.; PEREIRA, I.S.; SOARES, C.M.A.; FELIPE, M.S.S. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA. **Journal of Clinical Microbiology**. v.38, n.08, p.3106-3109, 2002.

NOBREGA, M.A., IVAN OVCHARENKO, VEENA AFZAL, AND EDWARD M. RUBIN. Scanning Human Gene Deserts for Long-Range Enhancers. **Science**. v.302, p. 413, 2003.

OSHITO, G.; WODICKA, L.M.; WASHBURN, M.P.; YATES III, J.R.; LOCKHART, D.J.; WINZELER, E.A. Parallel identification of new genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genome Biol.**, v.12, n.8, p.1210-1220, 2002. Disponível em <http://www.genomebiology.com>. Acesso em 30 jun.2003.

PALMER J.D. The mitochondrion that time forgot. **Nature**. v.387, p.454-455, 1997.

PALMER, A.M.; GREENGRASS, P.M.; CAVALLA, D. The role of mitochondria in apoptosis. **Drugs News Perspect**. v.13, n.6, p.378-384, 2000.

PATTERSON, K.M.; ENDRIZZI, M.; BIRREN, B.; LANDER, E.S. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. **Nature**, v.423, n.6937, p.233-234, 2003.

PEREIRA, M., FELIPE, M.S.S., BRÍGIDO, M.M., SOARES, C.M.A., AZEVEDO, M.O. 2000. Molecular cloning and characterization of a glucan synthase gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Yeast**. v.16, p.451-462.

PERTSEMLIDIS, A.; FONDON, J.W. Having a BLAST with Bioinformatics (and avoiding BLASTphemy. *Genome Biology*. V.2(10), 2001. Disponível em <http://genomebiology.com/2001/2/10/reviews/2002.1>. Acesso em set.2001.

RESTREPO-MORENO, A. Paracoccidioidomycosis. In: MURPHY, J.W., FRIEDMAN, H. ; BENDINELLI, M. (eds). **Fungal Infections and Immune Responses**. New York :Plenum Press, 1993. p. 251-276

RICHARDSON, M.D., WARNOCK, D.W. **Fungal Infection – Diagnosis and Management**. Oxford: Blackwell Science ,1997. p. 191-192.

SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning – a laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory Press**. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol.**, v.40, n.3, p.225-242, 2002.

SANO, A.; YOKOYAMA, K.; TAMURA, M.; MIKAMI, Y.; TAKAHASHI, I.; FUKUSHIMA, K.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. Detection of gp43 and ITS1-5.8S-ITS-2 ribosomal RNA genes of *Paracoccidioides brasiliensis* in paraffin-embedded tissue. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**. v. 42, n.1, p.23-27, 2001.

SARASTE, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. **Science**. v.283, n.5407, p. 1488-93, 1999.

SCHATZ, G. Mitochondria: beyond oxidative phosphorylation. **Biochim. Biophys. Acta** v.1271, p.123-126, 1995.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; PEREIRA, P.M.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E.; DUARTE M.I.S.; ASSIS, C.M.; GERALDES, E.A.; SALDIVA, P.H.N. Lung tissue mechanics in the early stages of induced paracoccidioidomycosis in rats. **Braz J Med Biol Res**, v.30, n.10, p.1175-1179, 1997.

SILVA, W.P.; SOARES, R.B.A.; JESUINO, R.S.A.; IZACC, S.M.S.; FELIPE, M.S.S.; SOARES, C.M.A. Expression of alpha tubulin during the dimorphic transition of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**. v.39, p.457-462, 2001.

SMAILI, S.S.; HSU, Y.T.; YOULE, R.J.; RUSSELL, J.T. Mitochondria in Ca²⁺ signaling and apoptosis. **J Bioenerg Biomembr**; v.32, n.1, p.35-46, 2000.

STEINMETZ L.M.; SCHARFE C.; DEUTSCHBAUERAM, MOKRANJAC D., HERMAN Z.S.; JONES T.; CHU A.M.; GIAEVER G.; PROKISCH H.; OEFNER P.J.; DAVIS R.W. Systematic screen for human disease genes in yeast. **Nature Genetics** v.31, n.4, p.400-404, 2002.

STRAUSBERG, R.L. et al. Generation and initial analysis of more than 15.000 full-length human and mouse cDNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Disponível em: <<http://pubmedcentral.nih.gov>> Acesso em 01 out 2003.

TAYLOR, S.W., EOIN FAHY, BING ZHANG, GARY M. GLENN, DALE E. WARNOCK, SANDRA WILEY, ANNE N. MURPHY, SARA P. GAUCHER,

RODERICK A. CAPALDI, BRADFORD W. GIBSON, AND SOUMITRA S. GHOSH. Characterization of the human heart mitochondrial proteome. **Nature Biotechnology** v.21, 2003.

THORSNESS P.E.; FOX T.D. Nuclear Mutations in Yeast That Affect the Escape of DNA from Mitochondria to the Nucleus. **Genetics**. v.134, p.21-28, 1993.

TZAGOLOFF, A. Genetic and translational capabilities of the mitochondrion. **Bio Science**, v.27, p.18-23, 1997.

WALLACE, D. Mitochondrial disease in man and mouse. **Science**. v.283, n.5407, p.1482-1488,1999.

WANG, J.T.L.; Rozen, S.; Shapiro, B.A.; Shasha, D.; Wang, Z.; Yin, M. New techniques for DNA sequence classification. **Journal of Computational Biology**. v.6, n.2, p.209-218, 1999.

YAFFE, M.P. The Machinery of mitochondrial inheritance and behavior. **Science**. v.283, n.5407, p.1493-1497, 1999.

6 – Anexos

6.1. Tabelas

TABELA 1 - Número de pareamentos significativos (E-value $\leq 10^{-5}$) de genes putativos de *Paracoccidioides brasiliensis* contra os produtos gênicos de *S. cerevisiae* e *H. sapiens* relacionados à função mitocondrial:

Organismo	Produtos gênicos	Seqüências de <i>P. brasiliensis</i> E-value $\leq 10^{-5}$	"Full-Length" Clusters
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	787	532	194
<i>Homo sapiens</i>	984	485	161
<i>S. cerevisiae</i> + <i>H. sapiens</i>	—	552	104
Total	1771	1.569	429

TABELA 2 – Distribuição do número de seqüências nucleotídicas de *P. brasiliensis* de função mitocondrial identificadas por organismo que fornece proteínas com maior similaridade encontradas no nr do GenBank® - (NCBI)

<i>Acremonium chrysogenum</i>	01
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	01
<i>Ajellomyces capsulata</i>	21
<i>Alternaria alternata</i>	01
<i>Anopheles gambiae</i>	01
<i>Arabidopsis thaliana</i>	05
<i>Arthroderma benhamiae</i>	01
<i>Arxula adeninivorans</i>	01
<i>Aspergillus amstelodami</i>	01
<i>Aspergillus awamori</i>	03
<i>Aspergillus flavus</i>	01
<i>Aspergillus fumigatus</i>	42
<i>Aspergillus nidulans</i>	30
<i>Aspergillus niger</i>	42
<i>Aspergillus oryzae</i>	20
<i>Aspergillus terreus</i>	03
<i>Blumeria graminis</i>	03
<i>Bos taurus</i>	01
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	01
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	03
<i>Burkholderia fungorum</i>	08
<i>Caenorhabditis elegans</i>	02
<i>Candida albicans</i>	05
<i>Candida tropicalis</i>	01
<i>Caulobacter crescentus</i>	01
<i>Cavia porcellus</i>	01
<i>Chaetosphaeria canirostris</i>	01
<i>Chloroflexus auranticus</i>	01
<i>Ciona intestinalis</i>	01
<i>Coccidioides immitis</i>	14
<i>Coccidioides posadasii</i>	01
<i>Cochliobolus carbonum</i>	03
<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	02
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	01
<i>Colletotrichum trifolii</i>	01
<i>Coprinopsis cinerea</i>	01
<i>Cricetulus sp.</i>	01

<i>Cryptococcus neoformans</i>	01
<i>Dictyostelium discoideum</i>	01
<i>Drosophila melanica</i>	01
<i>Drosophila nebulosa</i>	01
<i>Echinococcus multilocularis</i>	02
<i>Emericella nidulans</i>	161
<i>Entamoeba histolytica</i>	01
<i>Entodinium caudatum</i>	01
<i>Escherichia coli</i>	06
<i>Fusarium oxysporum</i>	01
<i>Fusarium solani</i>	01
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	01
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	01
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	01
<i>Gallus gallus</i>	02
<i>Geobacter metallireducens</i>	01
<i>Gibberella fujikuroi</i>	01
<i>Gibberella pulicaris</i>	01
<i>Glycyne max</i>	01
<i>Glomus mosseae</i>	01
<i>Haloferax volcanii</i>	01
<i>Homarus gammarus</i>	01
<i>Homo sapiens</i>	12
<i>Hordeum vulgare</i>	01
<i>Human herpesvirus B</i>	01
<i>Kluyveromyces lactis</i>	01
<i>Lentinula edodes</i>	02
<i>Leptosphaeria maculans</i>	06
<i>Leptospira interrogans</i>	01
<i>Lytechinus pictus</i>	01
<i>Magnaporthe grisea</i>	07
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	02
<i>Magnetospirillum rubrum</i>	01
<i>Microbulbifer degradans</i>	01
<i>Mucor rouxii</i>	01
<i>Mus musculus</i>	06
<i>Mycoplasma penetrans</i>	01
<i>Nectria haematococca</i>	03
<i>Neisseria meningitidis</i>	01
<i>Neurospora crassa</i>	865
<i>Nicotiana tabacum</i>	01
<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	01
<i>Ophiostoma novo-ulmi</i>	01
<i>Paecylomyces tenuipes</i>	03

<i>Pagrus major</i>	01
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	68
<i>Penicillium chrysogenum</i>	08
<i>Penicillium citrinum</i>	01
<i>Pinus sylvestris</i>	01
<i>Plasmodium falciparum</i>	01
<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>	01
<i>Podospora anserina</i>	14
<i>Pseudomonas putida</i>	01
<i>Pseudomonas syringae</i>	01
<i>Ralstonia metallidurans</i>	01
<i>Ralstonia solanacearum</i>	02
<i>Rattus norvegicus</i>	01
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	01
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	01
<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	01
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	59
<i>Septoria lycopersici</i>	01
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	02
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	01
<i>Streptomyces avermitilis</i>	01
<i>Synechocystis sp.</i>	01
<i>Talaromyces emersonii</i>	01
<i>Theileria parva</i>	01
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	02
<i>Thermotoga maritima</i>	01
<i>Tolypocladium inflatum</i>	01
<i>Trametes versicolor</i>	01
<i>Trichoderma harzianum</i>	01
<i>Tricophyton rubrum</i>	02
<i>Tuber borchii</i>	01
<i>Verticillium lecanii</i>	01
<i>Vigna unguiculata</i>	01
<i>Yarrowia lipolytica</i>	02
<i>Yersinia pestis</i>	01
<i>Zalerion arboricola</i>	03
<i>Zea mays</i>	02

TABELA 3 – Organização da Tabela Principal (disponível em http://200.136.178.19/web_g/DrNobrega.htm) com os resultados do projeto:

PB CLUSTER / LETTER	HUMAN GENE LENGTH	ALIGNMENT (Q/S)	% Id	YEAST GENE LENGTH	ALIGNMENT (Q/S)	% Id	Function/ Processes - HUMAN (G.O.)	Function/ Processes - YEAST (G.O.)	Functional Categories	P. <i>brasiliensis</i> BLAST NR ORGANISM DESCRIPTION LENGTH	SCORE/E-VALUE
EST-PbCC001-A01 889 letters 65 2e-12/ 107 4e-25	MitoID: 714-6912714 translocase of inner mitochondrial membrane 9 homolog ; translocase of inner mitochondrial membrane 9 (yeast) homolog Length = 89	71-268 / 12-77	40	>GCGSEQ1 nucleotide sequence of TIM9 Length = 87	23-265 / 3-83	58	Zinc ion binding; protein translocase activity/ mitochondrial translocation	Mitochondrial intermembrane space protein transporer complex	3	>gi 12230194 sp Q9Y8A7 IM09_EMENI Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM9 [Emericella nidulans] Length = 90	159 8e-38

4 - Figuras

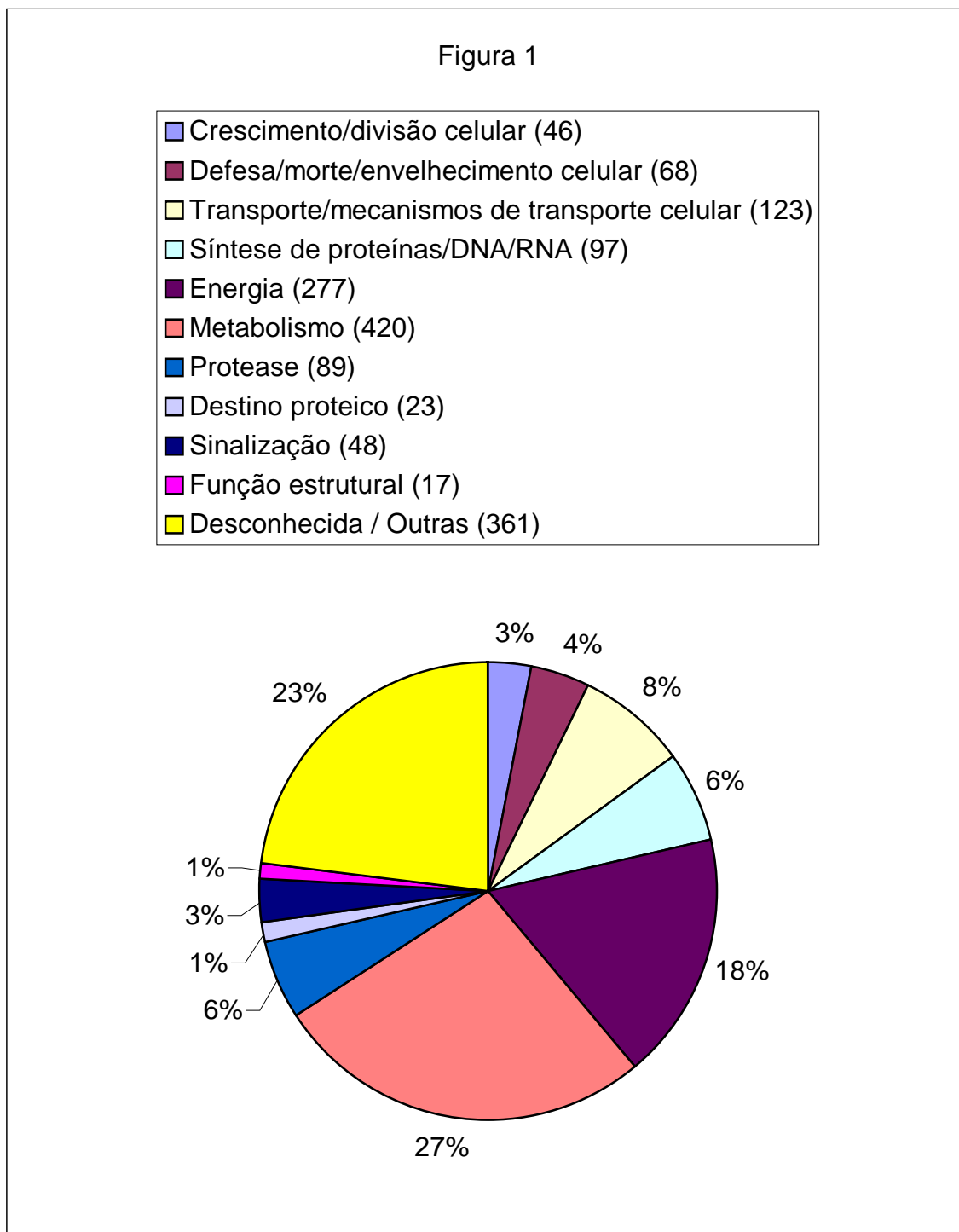


FIGURA 1 – Classificação funcional das seqüências protéicas de *Paracoccidioides brasiliensis* relacionadas à função mitocondrial.

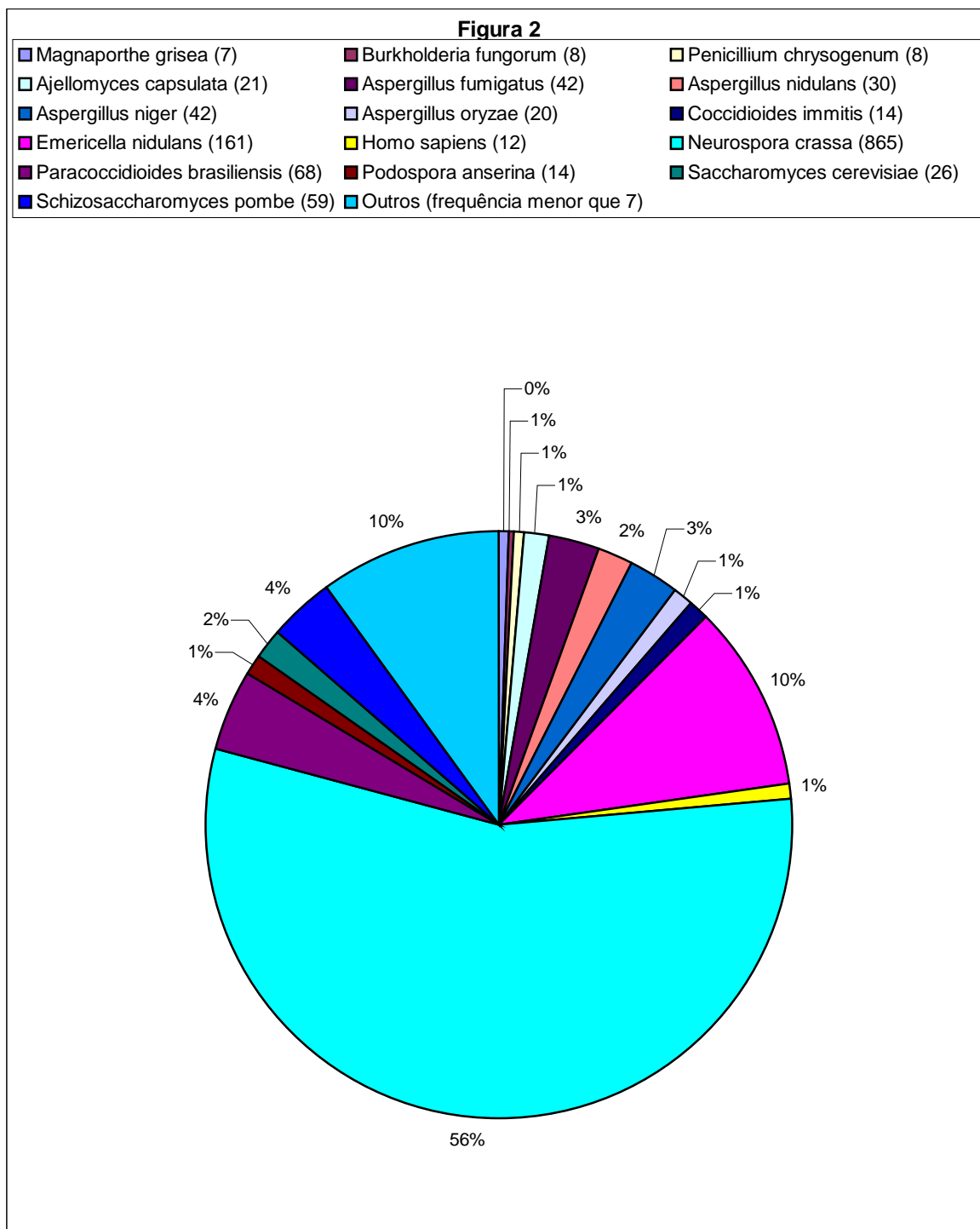


FIGURA 2 – Frequência comparada das espécies apresentando proteínas com alta similaridade aos produtos gênicos de *P. brasiliensis* (busca contra as seqüências de proteínas presentes no nr do GenBank® - NCBI)