

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
MARIA CAROLINA PIMENTEL

ANÁLISE GENÔMICA FUNCIONAL DA RESPOSTA AO
ESTRESSE NITROSATIVO NO FUNGO *Paracoccidioides*
brasiliensis

Mogi das Cruzes, SP

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
MARIA CAROLINA PIMENTEL

ANÁLISE GENÔMICA FUNCIONAL DA RESPOSTA AO
ESTRESSE NITROSATIVO NO FUNGO *Paracoccidioides*
brasiliensis

Dissertação apresentada ao mestrado em
Biotecnologia da Universidade de Mogi
das Cruzes como parte dos requisitos para
conclusão do curso

Orientador: Prof^a Dra Regina Lúcia Batista da Costa de Oliveira

Mogi das Cruzes, SP
2007

Financiamento: FAPESP

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Pimentel, Maria Carolina

Análise genômica funcional da resposta ao estresse nitrosativo no fungo *Paracoccidioides brasiliensis* / Maria Carolina Pimentel. -- 2007.

81 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2007

Área de concentração: Ciências biológicas

Orientador: Regina Lúcia Batista da Costa de Oliveira

1. *Paracoccidioides brasiliensis* 2. Microarranjo 3. Estresse nitrosativo I. Título II. Oliveira, Regina Lúcia Batista da Costa de

CDD 579.5

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às quatorze horas do dia trinta e um de julho de dois mil e sete, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Análise genômica funcional da resposta ao estresse nitrosativo do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Maria Carolina Pimentel**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 54 (cinquenta e quatro), a saber: 30 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores Regina Lúcia Batista da Costa Oliveira e Fábio Henrique Kwasniewski da Universidade de Mogi das Cruzes e Sérgio Akira Uyemura da Universidade de São Paulo, sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou a candidata. Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

Aprovada por unanimidade
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 31 de julho de 2007

Comissão Examinadora

Julgamento

Regina Lúcia BC Oliveira
Prof.ª Dr.ª Regina Lúcia BC Oliveira

Aprovada
(aprovado(a)/reprovado(a))

Fábio Henrique Kwasniewski
Prof. Dr. Fábio Henrique Kwasniewski

Aprovada
(aprovado(a)/reprovado(a))

Sérgio Akira Uyemura
Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura

Aprovado
(aprovado(a)/reprovado(a))

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Silvio e Maria Felomena, que sempre me ajudaram e me apoiaram e que com extrema dedicação me incentivaram em todos os momentos da vida, e que considero os maiores responsáveis por esta realização.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Dra. Regina Costa de Oliveira pela confiança, pelo constante apoio e dedicação durante todo o transcorrer do mestrado. Agradeço também pela oportunidade de aprender e de crescer e pelo privilégio de participar da equipe do Laboratório de Genômica.

Ao prof. Dr. Luiz R. Nunes por todos os ensinamentos, sabedoria e oportunidades.

À todos do Laboratório de Genômica do Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB), especialmente a Vivian S. da Silva e ao Marcus Vinicius de Oliveira pela paciência e ajuda que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho. Às equipes de outros laboratórios em especial a Dr. Márcia Ferreira, pelo ensinamento sobre cultivo de *Pb* e extração de RNA.

À Universidade de Mogi das Cruzes e à Fundação de Amparo ao Ensino e à Pesquisa (FAEP) pelo apoio financeiro e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio ao projeto temático de *Paracoccidioides brasiliensis*.

Aos membros da banca de qualificação Prof. Dr. Tiago Rodrigues e Prof Dr. Douglas Mascara, e aos da banca de defesa, Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura e Prof. Dr. Fábio Henrique Kwasniewski, pelas correções e sugestões.

À Juliana Silveira de Paiva pela ajuda e compreensão em todos os momentos.

À Deus, pela força e por todas as bênçãos recebidas ao longo da vida.

Ao meu namorado Gustavo, por todo amor, paciência, compreensão e pelo apoio.

Aos meus pais, Silvio A. P. Pimentel e Maria Filomena de S. Pimentel, pelo amor, estímulo, apoio e incentivo ao longo de toda a minha vida. A minha irmã, Maria Cristina Pimentel, pela ajuda e principalmente pela compreensão.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto, o meu

MUITO OBRIGADA

RESUMO

O fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), a micose sistêmica granulomatosa mais prevalente da América Latina. A patogenicidade é descrita como consequência da transição dimórfica de micélio para levedura durante a infecção. O sistema imunológico inato, composto de neutrófilos e macrófagos, constitui o principal mecanismo de defesa contra a infecção por *P. brasiliensis*, mais que a resposta imune humoral, pois anticorpos específicos produzidos em grandes quantidades não conferem proteção a PCM. Macrófagos ativados por IFN- γ , TNF- α ou lipopolissacarídeos (LPS) produzem dois tipos de espécies reativas, que possuem atividade citotóxica: espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN). Para ter sucesso na colonização o fungo deve resistir aos mecanismos microbiocidas e microbiostáticos do sistema imunológico. Desta forma, este estudo procura definir os níveis de resistência de células leveduriformes, a forma patogênica de *P. brasiliensis*, à presença de concentrações crescentes do doador de óxido nítrico (GSNO), bem como verificar, por meio de hibridações com microarranjo de DNA, a expressão de possíveis genes envolvidos com a resistência a esta substância. Os dados dos experimentos de hibridação competitiva foram confirmados pela técnica de RT-PCR em tempo real para verificar o grau de concordância entre os resultados obtidos por duas metodologias independentes, cuja coincidência foi de 64%. Os resultados permitiram identificar genes ligados à resposta ao estresse nitrosativo em *P. brasiliensis*, com maior destaque para seqüestradores de NO e ERN, que podem exercer papel importante durante o processo de colonização do hospedeiro humano.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; microarranjo e estresse nitrosativo.

ABSTRACT

The thermodimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the etiologic agent of paracoccidioidomycosis (PCM), the most prevalent granulomatous systemic mycosis in Latin America. Pathogenicity is assumed to be a consequence of the dimorphic transition from mycelium to yeast cells during human infection. The innate immunological system, composed by neutrophils and macrophages, is the main defense mechanism against *P. brasiliensis* infection, whereas large amounts of specific antibodies do not confer protection to PCM. Macrophages activated by IFN- γ , TNF- α or lipopolysaccharide (LPS) release reactive species characterized by their cytotoxic activity: reactive oxygen intermediates and reactive nitrogen intermediates (RNI). To attain successful colonization the fungus has to counteract the microbiocidal and microbiostatic mechanisms of the immune system. So, this work tries to define the resistance of the pathogenic yeast form of *P. brasiliensis* to the nitric oxide donor (GSNO), and also, by using DNA microarray hybridization, identify genes involved with the resistance to this substance. The microarray data were confirmed by qRT-PCR, in order to check the concordance of the results through two independent methodologies, which gave 64% of coincidence. The results identified genes probably involved with the nitrosative response of *P. brasiliensis*, with prominence to the NO and RNI scavengers that can exert important role during the colonization of the human host.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*; microarray and nitrosative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Culturas de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> na forma micelial.	15
Figura 2: Culturas de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> na fase leveduriforme	15
Figura 3: Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose	19
Figura 4: Paracoccidioidomicose	21
Figura 5: Esquema com reação entre ERN e ERO.	27
Figura 6: Estrutura do GSNO	30
Figura 7: Arquitetura do chip de <i>P. brasiliensis</i> utilizado na hibridação competitiva em microarranjos de DNA	33
Figura 8: A metodologia de hibridação em microarranjos de DNA.	35
Figura 9: Curva de crescimento de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> em meio YPD na ausência e na presença de GSNO.	46
Figura 10: Análise do padrão de migração de RNAs de <i>P. brasiliensis</i> extraídos após exposição a GSNO.	47
Figura 11: Representação de 751 genes com variação na expressão estatisticamente significativa, após a exposição a GSNO.	48
Figura 12: Gráfico gerado pelo algoritmo FOM.	50
Figura 13: Agrupamento de 751 genes com variação estatisticamente significativa em 56 “clusters”.	51
Figura 14: Cluster 28	52
Figura 15: Cluster 29	53
Figura 16: Cluster 37	53
Figura 17: Cluster 30	54
Figura 18: Cluster 23	55

Figura 19: Cluster 47	56
Figura 20: Cluster 01	57
Figura 21: Cluster 41	59
Figura 22: “Clusterização” manual dos genes de Hsp16, 30 e 70.....	61
Figura 23: Padrão de variação de expressão dos genes através da hibridação em microarranjo comparado com RT-PCR em tempo real.	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-HPPD	4-hidroxil - fenil piruvato dioxigenase
ANOVA	Análise de variância
ATCC	American Type Culture Colection
cDNA	DNA complementar
Cy3-dCTP	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato acoplado ao fluoróforo Cianina 3
Cy5-dCTP	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato acoplado ao fluoróforo Cianina 5
D.O.	Densidade óptica
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
Fe-S	Ferro – enxofre
FOM	Figura de Mérito
GSNO	S-nitrosoglutationa
GSSG	Glutationa dissulfeto
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HO·	Radical hidroxil
Hsp	Proteínas de choque térmico
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LPS	Lipopolissacarídeos
Mb	Mega pares de bases

mRNA	RNA mensageiro
N ₂ O ₃	Trióxido de dinitrogênio
Nf-κB	Fator nuclear κB
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
ONOOH	Ácido peroxinitroso
PCM	Paracoccidioidomicose
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
RSNO	S-nitrosotiol
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SSC	Solução de citrato de sódio e cloreto de sódio
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
IFN-γ	Interferon-γ

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Considerações Gerais	13
1.2	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	14
1.3	Paracoccidioidomicose	18
1.4	Resposta Imunológica Contra Paracoccidioidomicose	23
1.5	Óxido Nítrico e Estresse Nitrosativo	25
1.6	Reação de ERN com Moléculas Biológicas	28
1.7	Defesas Microbianas ao Estresse Nitrosativo	30
1.8	Hibridação em Microarranjos de DNA	32
2	OBJETIVO	36
3	MÉTODOS	37
3.1	Cultivo de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	37
3.2	Curva de Crescimento de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	37
3.3	Estresse Nitrosativo	37
3.4	Extração de RNA	38
3.5	Avaliação da Qualidade do RNA Obtido.	39
3.6	Purificação do RNA	39
3.7	Marcação do cDNA para Hibridação Competitiva.	40
3.7.1	Síntese da Primeira Fita de cDNA	40
3.7.2	Síntese da Segunda Fita de cDNA.	40
3.8	Hibridação	41
3.9	Aquisição e Análise de Imagens	42

3.10 Gerenciamento de Bancos de Dados e Identificação de Genes Diferencialmente Expressos.	43
3.11 Confirmação dos Dados de Microarranjo por RT-PCR em Tempo Real	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Crescimento de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> em Presença de GSNO ...	45
4.2 Identificação de Genes Diferencialmente Expressos	47
4.3 Confirmação dos Resultados de Microarranjo por RT-PCR em Tempo Real	63
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	65
REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Mais de 100.000 espécies de fungos já foram descritas na literatura, mas somente uma pequena parcela delas é constituída de fungos patogênicos. Dentre estes, destacam-se os fungos dimórficos, que são capazes de se diferenciar em duas formas distintas: micélio e levedura, sem que este evento de diferenciação reversível seja essencial ao ciclo de vida do organismo. Fungos dimórficos são responsáveis pela maioria das infecções sistêmicas causadas em humanos, outros mamíferos e plantas. Dessa forma, têm sido estudados há anos, com destaque para *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffeii*, *Sporothrix schenckii* e *Candida albicans* que causam, respectivamente, as seguintes micoses sistêmicas: blastomicose, coccidioidomicose, histoplasmose, paracoccidioidomicose, peniciliose, esporotricose e candidíase (HORNBY *et al.*, 2004; ROONEY e KLEIN, 2002; HOGAN, KLEIN e LEVITZ, 1996).

Este fenômeno de diferenciação parece estar intimamente relacionado com a patogenicidade, pois isolados de *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*, quando incapazes de se diferenciar em leveduras, não são virulentos. Vários parâmetros químicos e ambientais têm sido relacionados com a transição dimórfica, entre eles os nutrientes, a temperatura, a disponibilidade de oxigênio, presença de metais de transição e quelantes. Em *P. brasiliensis* a transformação ocorre tanto em meios ricos em nutrientes como em meios definidos, ocorrendo dimorfismo, independente do meio em que ele se encontra (ANDRADE *et al.*, 2005; SAN BLAS e SAN BLAS, 1994; MARESCA e KOBAYASHI, 1989).

Associações entre morfogênese e virulência têm sido postuladas há muito tempo para os fungos dimórficos patogênicos, já que um morfotipo vive no meio ambiente ou como comensal, enquanto, o outro vive no interior do hospedeiro durante o processo de desenvolvimento da doença. Conídios ou fragmentos de micélio dispersos no ar ou presentes em excretas de animais são fontes potenciais para a contaminação humana, e acabam sendo inalados pelo hospedeiro. Após inalação, as células rapidamente se convertem para a forma leveduriforme. Assim, a infecção pode resultar em uma micose pulmonar, a qual pode se

tornar autolimitante, ou disseminar-se por outros órgãos, podendo levar à morte. A exceção é *S. schenckii*, o qual usualmente infecta por inoculação direta na pele, causando doença monocutânea ou linfática após conversão para levedura, apesar de alguns casos pulmonares terem sido reportados (HORNBY *et al.*, 2004; ROONEY e KLEIN, 2002).

As micoses sistêmicas apresentam uma série de características comuns e seus agentes etiológicos são encontrados nos solos ou em dejetos de animais, sendo as vias aéreas superiores a sua principal porta de entrada no organismo do hospedeiro vertebrado. O clima, características do solo e a presença de certos animais são fatores que também parecem influenciar a distribuição geográfica destes fungos (TABORDA *et al.*, 1998). A relação entre transição dimórfica e patogenicidade em um dos morfos torna o estudo deste mecanismo extremamente atraente, no sentido de elucidar o processo que desencadeia o dimorfismo.

Este trabalho se concentra no *Paracoccidioides brasiliensis*, agente etiológico de uma micose sistêmica granulomatosa denominada paracoccidioidomicose (PCM).

1.2 Paracoccidioides brasiliensis

O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico que cresce vagarosamente como micélio em temperatura ambiente, entre 23 e 28°C, e apresenta-se leveduriforme entre 35 e 37°C, tanto *in vitro* quanto em tecidos infectados. Como micélio, as colônias são pequenas, irregulares, com coloração branca cobertas por um curto micélio aéreo, e frequentemente aderem à superfície do ágar, sendo esta a provável forma encontrada no ambiente. Em microscopia óptica, as hifas (multicelulares) são finas, septadas e apresentam estruturas multinucleadas (**Figura 1**). As colônias de levedura apresentam coloração creme e são unicelulares, com células esféricas ou ovais, bi ou multinucleadas, multiplicando-se por brotamento polar ou multipolar, conferindo-lhes a característica de “roda de leme” (**Figura 2**). Ambas necessitam de grandes quantidades de oxigênio para o crescimento, entretanto, leveduras jovens podem se adaptar a pequenas quantidades de oxigênio e entrar em um estágio de latência (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002; CANO *et al.*, 1998a; BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993; MC EWEN *et al.*, 1987).

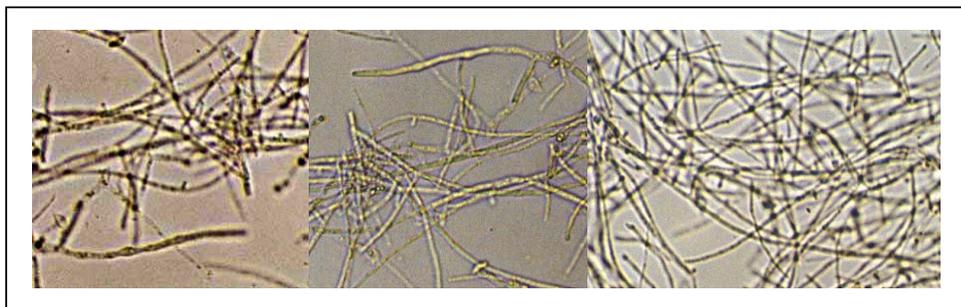


Figura 1: Fotos de culturas de *Paracoccidioides brasiliensis* crescidas em meio YPD líquido [extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), dextrose 2% (p/v), pH 6,3], a 25°C, apresentando-se em sua forma micelial.

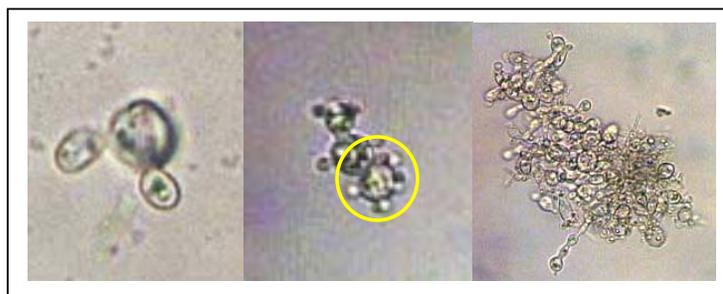


Figura 2: Fotos de culturas de *Paracoccidioides brasiliensis* crescidas em meio YPD líquido [extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), dextrose 2% (p/v), pH 6,3], a 37°C, apresentando-se em sua fase leveduriforme. Destacado em amarelo a “roda de leme”.

Estudos utilizando 10 isolados de *P. brasiliensis* mostraram que o tamanho do genoma varia de $26,3 \pm 0,1$ Mb (mega pares de bases) a $35,5 \pm 0,2$ Mb na célula leveduriforme, em conídios, este conteúdo não variou significativamente, apresentando $30,2 \pm 0,8$ Mb em *P. brasiliensis* ATCC 60855. Todos os isolados estudados apresentaram-se haplóides, podendo possuir 4 ou 5 cromossomos (ALMEIDA *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2005; BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002; CANO *et al.*, 1998a).

Inicialmente o *P. brasiliensis* era classificado, pela sistemática clássica, como um fungo imperfeito do filo Deuteromicota, classe Hyphomycetes, pelo fato de não ser conhecida nenhuma estrutura sexual que permitisse uma classificação mais precisa. Embora o estágio telemórfico (sexual) ainda não tenha sido determinado, transcritos que codificam fatores de transcrição possivelmente relacionados ao desenvolvimento sexual, homólogos ao do *Aspergillus nidulans*, já foram encontrados. Atualmente, através de comparação filogenética baseada nas seqüências de rRNA da subunidade ribossomal 28S, o *P. brasiliensis* foi mais precisamente classificado como pertencente ao Filo Ascomycota, Classe Plectomycetes, Ordem Onygenales e Família Onygenaceae *sensu lato*, juntamente com o *Blastomyces dermatitidis* e o *Histoplasma capsulatum* (BAGAGLI *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2005; VERINAUD, SOUTO e BRITO, 2004).

O ciclo de vida e o microhabitat deste fungo dimórfico na natureza ainda são desconhecidos. Acredita-se que o *P. brasiliensis* possa ser encontrado saprofiticamente na natureza onde, provavelmente, clamidósporos e conídios do fungo estejam presentes no solo ou em restos vegetais. Esta hipótese é apoiada pelo fato do fungo já ter sido isolado em solos de regiões endêmicas como Argentina e Venezuela. Entretanto, muitas tentativas semelhantes de isolar o fungo do solo falharam. No Brasil foi isolado em duas ocasiões em condições naturais de cultivo de café (MARQUES, 2003; BAGAGLI *et al.*, 1998; SILVA-VERGARA e MARTINEZ, 1998). Porém, devido aos raros isolamentos de *P. brasiliensis* em amostras de solo, e que geralmente não são confirmadas em amostras repetidas retiradas dos mesmos locais, alguns autores não aceitam que o solo seja o habitat permanente do fungo e sugerem que este patógeno resida apenas temporariamente e por um período variável nestes ambientes (DÍAZ, 2007).

Nos estudos epidemiológicos realizados em área rural endêmica (Ibiá/MG), indivíduos com antecedentes de contato com lavoura de café mostraram-se significativamente reativos à paracoccidioidina, sugerindo uma relação entre atividades de cultivo de café e transmissão de *P. brasiliensis* (SILVA-VERGARA e MARTINEZ, 1998). Além do solo, o *P. brasiliensis* já foi isolado nas fezes de alguns animais silvestres, como de morcegos frugívoros (*Artibeus lituratus*) (SOUTO, 2006) e pingüins (*Pygoscelis adeliae*) na região uruguaia da Antártida (BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993). O *P. brasiliensis* foi também isolado de tecidos de tatus (*Dasypus noveminctus*), no sul do Pará (1986 e 1989), na Serra da Mesa, em Goiás (1998), em diferentes regiões da área endêmica de Botucatu (1998), na Colômbia (1999) e na região mineira de Ibiá (2000) sendo este animal provável reservatório do fungo. Em 2002 foi relatado o primeiro caso de PCM em cão de vida estritamente urbana (MARQUES, 2003; BAGAGLI *et al.*, 1998; SILVA-VERGARA e MARTINEZ, 1998). A característica das áreas endêmicas e dados laboratoriais sugerem que o microhabitat do fungo deve ser em ambientes úmidos (BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993; RESTREPO, MC EWEN e CASTAÑEDA, 2001).

Muitos autores têm tentado, sem sucesso, correlacionar características de isolados de *P. brasiliensis* com sua virulência. Através de técnica de RAPD (polimorfismo de DNA amplificado randomicamente), marcadores foram usados para tentar estabelecer relações entre epidemiologia e filogenia de fungos isolados com diferentes graus de virulência e originários de regiões geográficas distintas. Os resultados apontaram uma grande variação genética com relação à origem geográfica dos isolados analisados, porém, estes estudos não permitiram correlacionar a virulência dos isolados ou patologia da doença com os diferentes padrões

genéticos verificados (CALCAGNO *et al.*, 1998; HAHN *et al.*, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2004).

A patogenicidade parece estar ligada à transição dimórfica, pois isolados que são incapazes de sofrer esta diferenciação não são virulentos. O *P. brasiliensis* depende da temperatura de incubação como requerimento para a expressão da sua morfologia. A transição morfológica *in vivo* ocorre após a inalação dos conídios ou propágulos fúngicos, da fase micelial encontrada no ambiente, que ao atingirem o epitélio pulmonar do hospedeiro se transformam em leveduras, a forma patogênica. A transformação de hifas em células leveduriformes se inicia com o aumento do seu diâmetro na região interseptada e conseqüente rompimento da parede externa, a qual passa a permanecer em contato direto com o meio externo. Com este aumento, os espaços interseptais tendem a se separar, formando células isoladas e arredondadas, entre 5 e 25 μm de diâmetro. A levedura de *P. brasiliensis* pode ligar-se a componentes da matriz extracelular, tais como fibronectina e colágeno. A adesão às células do hospedeiro e à superfície da mucosa é um passo fundamental no estabelecimento da infecção (NUNES *et al.*, 2005; ROONEY e KLEIN, 2002; MC EWEN *et al.*, 1987).

A mudança morfológica no *P. brasiliensis* é acompanhada de extensas mudanças na composição da parede celular, como migração e reorganização dos lipídeos de membrana, especialmente glicosfingolipídeos. Outra mudança importante é o aumento no conteúdo de quitina e uma mudança na ligação de glucana de β -1,3-glucana, único polímero presente na parede celular da forma micelial, para α -1,3-glucana quando o fungo adota a fase leveduriforme. Esta forma do polímero tem sido relacionada com o potencial patogênico deste fungo, pois isolados com perda quase completa desta glucana mostraram-se avirulentos em camundongos (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002; BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993; HECTOR, 1993).

As vias de sinalização que controlam as mudanças morfológicas em *P. brasiliensis* ainda não estão bem esclarecidas, mas o envolvimento de vias de transdução de sinais do AMPc (mono-fosfato de adenosina cíclico) e MAPK (“mitogen activated protein kinase”) têm sido relatado em diferentes fungos dimórficos (BORGES-WALMSLEY e WALMSLEY, 2000).

Estudos realizados por Nemecek, Wuthrich e Klein (2006) indicam a presença de genes com expressão diferencial em micélio e levedura em fungos dimórficos patogênicos. Um destes genes observados foi o da histidina quinase, que são proteínas de transdução de sinal utilizadas para responder a sinais ambientais e controlar o processo de desenvolvimento. Homólogos deste gene foram encontrados em *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* e *C. immitis*. As

seqüências e os domínios chave desta proteína são altamente conservados em *H. capsulatum* e *C. immitis*. Além da presença em múltiplas espécies, a função desta proteína também está conservada nos fungos *B. dermatitidis* e *H. capsulatum*, organismos em que regula o dimorfismo e a expressão de genes de virulência e patogenicidade, o que sugere que ela possa desempenhar esta função em outros fungos dimórficos. Estudos recentes indicam a presença de vários genes que estão expressos de maneira distinta na fase micelial e leveduriforme do *P. brasiliensis*, possibilitando um maior conhecimento da transição dimórfica deste fungo e sua interação e adaptação ao hospedeiro, devendo ser destacado o aumento da expressão do gene da 4-HPPD (4-hidroxil-fenil piruvato dioxigenase) na fase leveduriforme, cuja inibição bloqueou a diferenciação micélio-levedura neste fungo (BASTOS *et al.*, 2007; NUNES *et al.*, 2005).

Quando exposto a estresse ambiental, tal como o aumento da temperatura, os organismos respondem com um rápido aumento da produção de proteínas de “heat shock”, que presumivelmente protegem as células contra efeitos deletérios deste tipo de estresse. Apesar do estudo destas proteínas em *P. brasiliensis* ainda ser restrito, foi demonstrado uma forte indução da Hsp70 na fase leveduriforme deste fungo, podendo estar relacionada à interação parasita-hospedeiro durante o processo infeccioso (DA SILVA *et al.*, 1999).

O principal componente antigênico descrito no *P. brasiliensis* é a gp-43, uma glicoproteína exocelular secretada pelo fungo durante a fase patogênica, cujo anticorpo é encontrado no soro da maioria dos pacientes com PCM. Pacientes com a forma severa da doença apresentaram altos títulos do anticorpo contra gp-43, que tendem a decrescer com o sucesso do tratamento. O gene que codifica para esta proteína é um dos genes mais intensamente expressos durante a transição micélio levedura (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002; MORAIS *et al.*, 2000).

1.3 PARACOCCIDIOIDOMICOSE

A paracoccidiodomicose (PCM) é uma das mais importantes micoses sistêmicas da América Latina. Essa enfermidade foi descrita pela primeira vez no Brasil por Adolfo Lutz em 1908, sendo também conhecida como blastomicose sul-americana ou micose de Lutz-Splendore-Almeida (SAN-BLAS e NINO-VEGA, 2001; TRABULSI *et al.*, 1999; ARISTIZABAL *et al.*, 1998).

Dados epidemiológicos indicam uma ampla distribuição geográfica, estendendo-se do México à Argentina, embora a doença não ocorra em todos os países dentro destes limites, como pode ser observado na **figura 3**. O Brasil apresenta 80% dos casos reportados, seguido pela Colômbia e Venezuela. Constitui-se na principal micose sistêmica da América Latina, sendo classificada como a primeira causa de morte entre as micoses sistêmicas, e a oitava, quando consideradas as doenças infecciosas e parasitárias (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2005; CASOTO, 1990).

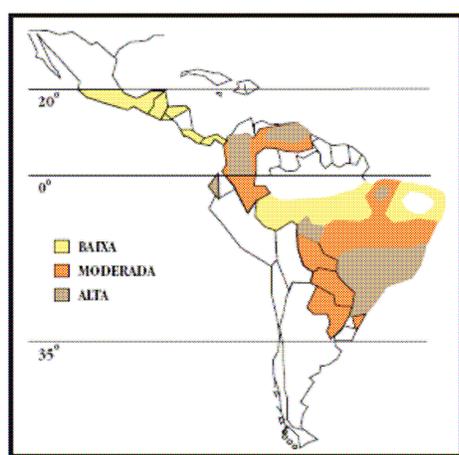


Figura 3: Distribuição geográfica da paracoccidiodomicose. (Fonte: SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

Nos países onde a doença é endêmica, os casos não são distribuídos homogeneamente pelo território, mas concentram-se próximos as florestas úmidas, tropicais e subtropicais. As condições predominantes nas regiões com alta endemia são temperatura entre 17 e 24°C, volume de chuva entre 900 a 1810 mm por ano, floresta abundante com muitos cursos de água, além de inverno curto e verão chuvoso. Nos casos reportados fora desta região, os pacientes viveram ou visitaram tais locais e, na maioria destes casos, os períodos de latência entre a saída da região endêmica e as manifestações clínicas foram prolongados, em média 15 anos (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002; RESTREPO, Mc EWEN, CASTAÑEDA, 2001; BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993).

Estima-se que nas regiões endêmicas, em que vivem aproximadamente 90 milhões de pessoas, 10 milhões poderiam estar infectadas por *P. brasiliensis*, e mais de 2% destes podem vir a desenvolver a doença. Apesar do contato com o fungo, acredita-se que, apenas esta minoria irá desenvolver a doença, pois a evolução da infecção está intimamente relacionada com a imunidade do paciente (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 2002; TRABULSI *et al.*, 1999).

A PCM raramente é observada em crianças (apenas 3%) ou adultos jovens (10%) e é regularmente diagnosticada em adultos com idade entre 30 e 60 anos. Dentre estes, a maior incidência (70% dos casos) é observada em trabalhadores rurais (BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993).

Esta micose é mais freqüente em homens adultos do que em mulheres, com uma relação média de 13:1, sendo que esta proporção pode chegar a 150:1 em algumas regiões, como na Colômbia, Equador e Argentina. Esta maior incidência em homens não pode ser atribuída à exposição, porque testes de reação intradérmica com a paracoccidioidina, em indivíduos saudáveis de áreas em que a doença é endêmica, não revelaram diferença entre os sexos, o que sugere que ambos os sexos adquirem a infecção subclínica na mesma proporção, mas a progressão da doença é muito mais freqüente em homens, sugerindo que fatores hormonais interfiram no desenvolvimento da paracoccidioidomicose (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002; ARISTIZABAL *et al.*, 1998).

Estudos *in vitro* também sugerem a influência hormonal na patogênese da PCM, pois demonstraram que o estrogênio é capaz de inibir a transição de conídio ou micélio para levedura. Em estudos *in vivo*, utilizando camundongos, também foi relatado influência hormonal nesta micose, pois os resultados mostraram que, em fêmeas, a transição para levedura não ocorreu e a infecção foi contida, ao contrário do que foi observado para os machos, corroborando a idéia de que o dimorfismo está diretamente relacionado à virulência e explicando as discrepâncias na epidemiologia entre homens e mulheres (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002; ARISTIZABAL *et al.*, 1998; RESTREPO *et al.*, 1984).

Também foi observado que estrogênios, como o estradiol, estimulam fortemente a atividade de macrófagos, e há uma predominância de macrófagos em fêmeas infectadas com *P. brasiliensis*. Já nos machos infectados a maioria das células encontradas foi neutrófilos polimorfonucleares o que demonstra que os macrófagos devem induzir uma resposta mais eficiente contra este patógeno (ARISTIZABAL *et al.*, 1998).

A doença apresenta múltiplas manifestações, desde lesões pulmonares assintomáticas a infecções sistêmicas generalizadas, e duas formas clínicas de progressão são reconhecidas, a forma aguda e a crônica. Ambas são associadas com muitas seqüelas, incluindo principalmente, lesões pulmonares, que reveladas por raios-X, apresentam-se nodulares, infiltrativas e fibróticas, freqüentemente bilaterais e preferencialmente localizadas na região central ou na porção inferior dos pulmões (**Figura 4A**). Testes da função respiratória revelaram que os danos pulmonares são na maioria das vezes do tipo obstrutivo. A forma aguda ou subaguda, também denominada de tipo juvenil, representa apenas 3-5% dos casos

que em sua maioria são crianças e jovens, e caracteriza-se pelo curso rápido da doença que se desenvolve em semanas a meses. É multifocal e disseminada, com acometimento de vários órgãos como fígado, baço e medula óssea. O acometimento pulmonar ocorre em menos de 5% dos casos. É a mais séria e com pior prognóstico, que se não tratada, freqüentemente, culmina com a morte do paciente (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002; CANO *et al.*, 1998a; BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993).

A forma crônica, denominada tipo adulto, representa mais de 90% dos casos, pode apresentar-se tanto multifocal quanto unifocal. A progressão é lenta e pode durar meses a anos para desenvolver-se completamente, atingindo principalmente os pulmões (**Figura 4A**), que em 25% dos casos são o único órgão afetado (unifocal). Nos casos onde a doença é multifocal ocorrem lesões extrapulmonares, afetando especialmente mucosas, oral e nasal, e a pele, formando vesículas ou pápulas que ulceram e formam pontos hemorrágicos bastante evidentes (**Figura 4B**). Há uma semelhança com a tuberculose com a qual coexiste em 10% dos casos (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002; CANO *et al.*, 1998a; BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993).

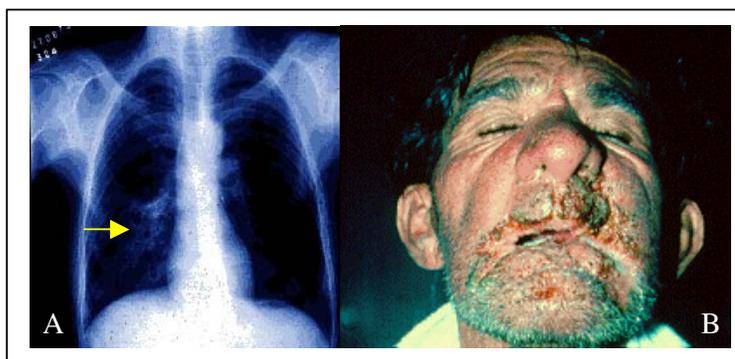


Figura 4: Paracoccidioidomicose. A – radiografia pulmonar de um paciente com PCM (a seta amarela indica a região pulmonar afetada). B - lesões na pele e mucosas associadas a PCM. Fontes: A – Adaptado de QUAGLIATO *et al.* (2007) e B – The University of Adelaide (2007).

A evolução e a gravidade da doença variam largamente entre os pacientes e as várias formas clínicas observadas estão relacionadas aos diferentes níveis de resposta imune do hospedeiro. Os pacientes portadores da forma aguda severa da doença freqüentemente apresentam depressão da resposta imune celular, diminuição da reatividade a testes cutâneos e altos níveis de anticorpos contra o *P. brasiliensis*. Nestes pacientes, a resposta tecidual é caracterizada pela ocorrência de granulomas frouxos que abrigam um grande número de fungos. Em indivíduos com as formas localizadas da doença, por outro lado, observam-se respostas positivas para provas de hipersensibilidade, baixos níveis de anticorpos específicos

e a formação de granulomas compactos com poucos fungos (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2005).

O tratamento da PCM é geralmente prolongado, 1 a 2 anos, podendo em alguns casos durar mais que 5 anos, com recidivas e seqüelas freqüentes. Mesmo após tratamento adequado, com regressão da doença, esta pode deixar seqüelas que afetarão o bem-estar do paciente, sendo comum a fibrose do tecido afetado. As conseqüências mais comuns e incapacitantes ocorrem por lesões no pulmão. Dentre os antifúngicos que podem ser utilizados para o tratamento da PCM estão a anfotericina B, os sulfamídicos (sulfadiazina, associação sulfametoxazol/trimetoprima) e os azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol). A droga de escolha é o cetoconazol ou itraconazol que permite o controle das formas leves e moderadas da doença em menor período de tempo. Pacientes com formas graves devem receber anfotericina B ou associação sulfametoxazol-trimetoprima, que apresentam altas taxas de recidiva (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2005; SHEEHAN, HITCHCOCK e SIBLEY, 1999).

O voriconazol, um antifúngico triazólico de segunda geração, tem se mostrado eficaz para outras micoses, e parece promissor também para a PCM, segundo resultados baseados em dados clínicos, sorológicos e radiológicos (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; MARQUES, 2003).

A paracoccidiodomicose é freqüentemente relatada como uma doença oportunista, sendo reativada, ou apresentando sinais clínicos pela primeira vez, em pacientes submetidos a alguma forma de imunossupressão. Existem relatos da micose em pacientes imunodeprimidos após transplante renal. Há registro na literatura de poucos casos de associação entre PCM e carcinomas, dentre estes os mais comuns são em localizações como pulmões, orofaringe e laringe, mais raramente, porém também relatados, estão as neoplasias da série hematológica, como leucemia e linfoma (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; ZAVASCKI, BIENARDT e SEVERO, 2004).

1.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA PARACOCCIDIODOMICOSE

O sistema imunológico inato compreende o sistema fagocitário que constitui um importante mecanismo na resposta imune natural ou adaptativa contra vários patógenos. A resposta imune celular é caracterizada pela produção de citocinas como interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina 12 (IL-12) que são requeridos para a ativação de macrófagos (ANDRADE *et al.*, 2005; MISSALL, LODGE e McEWEN, 2004; GONZALEZ *et al.*, 2003).

Dados clínicos e experimentais indicam que a resposta imune celular também é o principal mecanismo de defesa contra a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*, mais que a resposta imune humoral, pois anticorpos específicos produzidos em grandes quantidades não conferem proteção a PCM. Alguns estudos sugerem que os macrófagos desempenham um papel fundamental na resistência ao fungo dimórfico *P. brasiliensis*, pois formam uma das principais células de defesa, fagocitando o fungo, que pode replicar-se no interior da célula na ausência, mas não na presença de IFN- γ . Estudos preliminares demonstraram que macrófagos murinos ativados com a citocina IFN- γ exerceram um papel fungicida tanto em leveduras quanto em conídios de *P. brasiliensis*, o que sugere que as citocinas, especialmente a IFN- γ , desempenham um papel importante na proteção contra a PCM, como já havia sido demonstrado por Cano e colaboradores (1998b) em que a diminuição de IFN- γ piorou o quadro de PCM em camundongos infectados (GONZALEZ *et al.*, 2000; BOCCA *et al.*, 1998). Este dado também foi demonstrado em outro estudo utilizando modelo murino, uma vez que os animais com a atividade de macrófagos bloqueada foram extremamente suscetíveis à infecção. Na ausência de tais citocinas, como em hospedeiros suscetíveis, os macrófagos servem como um ambiente seguro no qual o fungo pode replicar-se intracelularmente e disseminar a partir dos pulmões para outros órgãos (ANDRADE *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2002; BRUMMER *et al.*, 1989). A análise do perfil de produção de citocinas por monócitos de indivíduos saudáveis desafiados com isolados de *P. brasiliensis* que são altamente virulentos (Pb18) e também com os que apresentam menor virulência (Pb265), mostrou que o isolado mais virulento induz a produção de citocinas pró e antiinflamatórias (IL-1 β , IL-6 e IL-10) em menos tempo, além de produzi-las de forma contínua e em níveis mais elevados. Os altos níveis de produção de IFN- γ e TNF- α também foram detectados em cultura de células, de paciente curados de PCM, após estímulo com a glicoproteína gp-43 (KUROKAWA, *et al.*, 2007; SADAHIRO, 2007).

Macrófagos ativados por IFN- γ , TNF- α ou lipopolissacarídeos (LPS) produzem dois tipos de espécies reativas, que possuem atividade citotóxica: espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (CAMPOS *et al.*, 2005; MISSALL, LODGE e MC EWEN, 2004; ANJUN *et al.*, 2002).

Alguns estudos demonstraram que a morte deste fungo por macrófagos murinos ativados parece ser independente de ERO, uma vez que não foi contida pelas enzimas superóxido dismutase e catalase. Por outro lado, além de ter sido verificado a inibição do crescimento de *P. brasiliensis*, pelo NO e ERN, o tratamento com diferentes inibidores de NO (arginase, N^G-monometil-L-arginina e aminoguanidina) reverteu a inibição do processo de transição dimórfica, o que sugere que este fenômeno é mediado pela produção de NO (NASCIMENTO *et al.*, 2002; GONZALEZ *et al.*, 2000).

Hoje é bem estabelecido que uma grande quantidade de NO é produzido durante infecção microbiana causada por quase todos os patógenos incluindo bactérias, vírus, parasitas e fungos (ZAKI, AKUTA e AKAIKE, 2005). Em *P. brasiliensis*, estudos recentes indicaram que IFN- γ ativa a produção de NO pelos macrófagos, e esta espécie reativa de nitrogênio inibe a transformação de conídios para levedura e apresenta atividade microbicida (GONZALES *et al.*, 2000), semelhante ao que já foi verificado em outros microrganismos patogênicos, como *Leishmania major* (MATTNER *et al.*, 2004), *Trypanosoma cruzi* (SILVA, MACHADO e MARTINS, 2003), *Plasmodium falciparum* (CLARK *et al.*, 1992), *Schistosoma mansoni* (JAMES & GLAVEN, 1989), *Candida albicans* (BLASI *et al.*, 1995) entre outros. Embora o mecanismo envolvido na resistência da PCM não seja bem compreendido, o TNF- α parece participar da formação de granulomas que restringem a disseminação do fungo, enquanto o NO deve participar do processo de morte deste patógeno (NASCIMENTO *et al.*, 2002). Os dados apresentados por Nascimento e colaboradores (2002), em estudo realizado com camundongos resistentes e suscetíveis, indicam que a produção de NO é essencial para o controle da PCM uma vez que, independentemente da cepa utilizada (resistente ou suscetível), a deficiência na produção de NO causou infecção disseminada. Porém este estudo também mostrou que a maior diferença na resposta de macrófagos está relacionado a produção de NO e TNF- α . Macrófagos de camundongos suscetíveis liberam uma quantidade grande e persistente de NO durante a infecção, enquanto os de camundongos resistentes produziram predominantemente TNF- α , o que sugere que a produção exacerbada de NO provavelmente iniba a produção de TNF- α .

Gonzalez, Restrepo e Cano (2007) demonstraram que o mecanismo fungicida mediado pelo NO por macrófagos ativados com IFN- γ contra conídios de *P. brasiliensis* é dependente

de interação com ferro, provavelmente por inibição de enzimas que contém este metal. Neste estudo foi observado que em macrófagos ativados, a ação inibitória do NO foi revertida com a adição de doadores de ferro, sem que houvesse alteração na produção de NO.

As ERO e ERN são críticas na defesa do hospedeiro não apenas por causarem danos aos patógenos, mas também por serem moléculas imunorreguladoras, que podem exercer papéis de sinalização intracelular. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por exemplo, além de afetar a proliferação de células vizinhas, pode facilitar a aderência do fagócito ao endotélio por aumentar a produção de moléculas de adesão. ERO podem promover um aumento da permeabilidade vascular, embora a extensão desta contribuição *in vivo* não esteja bem estabelecida. ERN e ERO podem estimular a produção de citocinas por fibroblastos e células epiteliais, além de alterarem a ativação de fagócitos e agregação plaquetária (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

1.5 ÓXIDO NÍTRICO E ESTRESSE NITROSATIVO

O NO é uma das mais importantes espécies reativas de nitrogênio que está envolvido em diversas funções fisiológicas, como vasodilatação, neurotransmissão e regulação da resposta imune (BRYAN *et al.*, 2004; CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002; STEFFEN *et al.*, 2001).

Como neurotransmissor o NO regula o peristaltismo intestinal, funções autônomas e neuroendócrinas. A diferenciação neuronal e o crescimento celular em geral também são afetados pelo NO. Além destes efeitos benéficos o NO também pode causar danos relevantes quando sua geração sobrepõe os mecanismos de defesa, nesta situação, tem sido relacionado a danos neuronais, como os encontrados na isquemia cerebral e mal de Parkinson. O NO é tanto um mensageiro celular rápido como um mediador citotóxico (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000; NICOTERA, BARNASSOLA e MELINO, 1999).

No sistema vascular, o NO controla a pressão sanguínea e inibe a agregação plaquetária. O excesso é implicado em inflamações crônicas como artrite reumatóide, e também em choque séptico, que em 50% dos casos é fatal, pois o aumento do NO provoca vasodilatação, o que conduz a uma queda acentuada na pressão sanguínea e a um colapso vascular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000; QUEIROZ e BATISTA, 1999).

O NO é sintetizado por reação enzimática através da oxidação de um dos nitrogênios do aminoácido L-arginina produzindo NO e L-citrulina. A reação catalítica responsável pela síntese de NO é realizada por uma família de enzimas NADPH dependentes, as óxido nítrico sintase (NOS), que possuem três isoformas descritas, sendo duas expressas constitutivamente e uma induzida (iNOS). Esta última isoforma é responsável pela produção de NO em células como macrófagos e neutrófilos, o qual está envolvido na inflamação e infecção. Em condições fisiológicas a célula produz apenas pequenas quantidades de NO através das NO sintase constitutivas, neuronal e endotelial. Em contraste, grandes quantidades de NO são geradas pela iNOS (PFEILSCHIFTER, EBERHARDT e HUWILER, 2003; BRÜNE e CANTONI, 2000). Estudos dos mecanismos moleculares da indução da iNOS revelaram que muitas citocinas são responsáveis por este fenômeno, incluindo TNF- α e IFN- γ , além de lipopolissacarídeos. Uma vez iniciada a produção de NO pela iNOS, ela se prolonga por várias horas e em concentrações altas o suficiente para se mostrarem tóxicas para a célula alvo, estas concentrações são da ordem de 30-50 μ M, enquanto as enzimas constitutivas produzem NO em concentrações da ordem de μ M (ZAKI, AKUTA e AKAIKE, 2005; DUSSE, VIEIRA e CARVALHO, 2003; CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

O NO difunde-se livremente para fora dos macrófagos e este efeito pode resultar na morte ou inibição de patógenos intra e extracelulares. Embora muitos alvos em potencial tenham sido identificados, o mecanismo básico da atividade antimicrobiana relacionada ao NO ainda não foi estabelecido (SCHAPIRO; LIBBY e FANG, 2003; ANJUN *et al.*, 2002).

A citotoxicidade do NO resulta de sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório. O acúmulo destas espécies reativas de nitrogênio modifica reversível ou irreversivelmente proteínas celulares e este ambiente hostil, com alteração do potencial redox, caracteriza o estresse nitrosativo (SAHOO, SENGUPTA e GHOSH, 2003).

O NO apresenta um elétron desemparelhado, sendo uma espécie radicalar, capaz de reagir com outros radicais importantes do ponto de vista biológico, como pode ser observado na **figura 5**. Uma das mais significantes reações do NO é com o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que resulta na formação do peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), um poderoso oxidante que tem mostrado ser fungicida e mais deletério aos microrganismos que o NO isolado. Em condições fisiológicas, o ácido conjugado do peroxinitrito, o ácido peroxinitroso ($ONOOH$) possui a mesma reatividade do radical hidroxil ($\cdot OH$). Macrófagos produzem $O_2^{\cdot-}$ e NO em quantidades

Além da S-nitrosação, ERN podem nitrosar resíduos fenólicos de tirosina e triptofano em várias proteínas, o que inibe a fosforilação protéica por tirosinas quinases (NEDOSPASOV *et al.*, 2000; ZHU *et al.*, 1998. SIMON *et al.*, 1996).

S-nitrosotióis e nitrotirosinas atuam na sinalização celular por alteração de proteínas quinases e fosfatases, proteínas G, canais iônicos e fatores de transcrição sensíveis a alterações redox como o fator nuclear κ B (NF- κ B) e ainda podem causar ou prevenir apoptose da célula do hospedeiro. A produção e disponibilidade de radicais tiil parecem ser críticas na modulação e sensibilidade das células a ERN (JOURD'HEUIL, JOURD'HEUIL e FEELISCH, 2003; HARE e STAMLER, 2005).

As ERN reagem com muitos componentes celulares incluindo metais de transição (especialmente o ferro), lipídeos, proteínas, enzimas e ácidos nucleicos. Estas perturbações resultam em danos ao DNA e à membrana, com inibição da replicação de DNA, proliferação celular e respiração, efeitos devastadores para fisiologia e viabilidade celular. Outro efeito de algumas ERN, como o ONOO^- , é a peroxidação lipídica (CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002; NITTLER *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 1998).

1.6 REAÇÃO DE ERN COM MOLÉCULAS BIOLÓGICAS

Efeitos tóxicos diretos do NO incluem a inibição da ribonucleotídeo redutase, pois ele reage rapidamente com os resíduos de tirosina que são essenciais para a atividade catalítica desta enzima, que converte ribonucleotídeo em desoxirribonucleotídeos, necessários para a síntese de DNA, fator que pode ser limitante na síntese do ácido nucleico (STEFFEN *et al.*, 2001; HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2000). Também pode ser citotóxico pela S-nitrosação de grupos tióis ou por inibição de centros ferro – enxofre (Fe-S) em várias enzimas, incluindo a aconitase. ERN podem também desaminar o N-terminal e outros grupamentos amino de proteínas, além da nitração e hidroxilação dos anéis aromáticos dos resíduos de aminoácidos (CAMPOS *et al.*, 2005; MISSALL, LODGE e McEWEN, 2004).

A mitocôndria é uma organela essencial para o funcionamento celular normal, sendo o principal local de síntese de ATP e da sinalização para apoptose. O complexo IV (citocromo C oxidase) é o acceptor final da cadeia respiratória, transferindo elétrons para o O_2 para formar H_2O . Acoplado a esta reação, a enzima bombeia prótons através da membrana, contribuindo para a geração do gradiente eletroquímico que dirige a síntese de ATP. Esta enzima contém

dois grupos heme A, ditos citocromo *a* e *a*₃, este último junto com o cobre adjacente (Cu_B), formam um centro metálico binuclear, onde o O₂ é reduzido. O NO inibe o complexo IV competitivamente por ligação ao citocromo *a*₃ reduzido, e também de forma não competitiva por ligar-se ao Cu_B. Vários estudos sugerem que o complexo IV não é o único local da cadeia respiratória que pode ser inibido pelo NO, há evidências para inibição também do complexo I, que parece ser devido a S-nitrosação de resíduos de cisteínas críticos para seu funcionamento (BURWELL *et al.*, 2006; MASON *et al.*, 2006; STEFFEN *et al.*, 2001; TORRES, DARLEY-USMAR e WILSON, 1995).

Alguns estudos também têm demonstrado o envolvimento do NO na apoptose, sendo que o efeito varia dependendo da concentração de NO e do tipo de célula, podendo tanto induzir quanto suprimir a apoptose. O efeito pró-apoptótico está associado a ativação da proteína supressora de tumor p53, liberação do citocromo *c* e ativação de caspases. O efeito anti-apoptótico do NO pode ser mediado por vários mecanismos como inativação, por nitrosação, de várias caspases. Outros mecanismos incluem super-regulação da proteína de choque térmico 70 (com conseqüente bloqueio do recrutamento da pró-caspase 9 e Apaf-1) e também aumento da expressão de Bcl-2, que inibem a liberação do citocromo *c* da mitocôndria (BRÜNE, KNETHEN e SANDAU, 1999; NICOTERA, BARNASSOLA e MELINO, 1999).

Muitos danos produzidos aos ácidos nucléicos por ERN incluem lesões ao DNA e desoxirribonucleotídeos livres e possuem potencial mutagênico por causar alterações da informação genética pelo pareamento errado das bases danificadas (KAMIYA, 2003; SIMON *et al.*, 1996).

Nos ácidos nucléicos, as ERN podem produzir nitração, nitrosação e desaminação das bases do DNA. Como exemplo, pode ocorrer desaminação de adenina a hipoxantina, citosina a uracila e guanina a xantina. Enquanto a adenina pareia com a timina, a hipoxantina pode parear com a citosina, já a uracila emparelha com adenina (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000; SINGH *et al.*, 1996).

O GSNO (S-nitrosoglutatona) é uma ERN que ocorre *in vivo*, e tem gerado muito interesse por sua habilidade de funcionar como um doador de NO e por sua habilidade de penetrar nas células e facilitar a nitrosação de alvos intracelulares (VENKETARAMANM *et al.*, 2005; FIROVED *et al.*, 2004; SCHAPIRO; LIBBY e FANG, 2003).

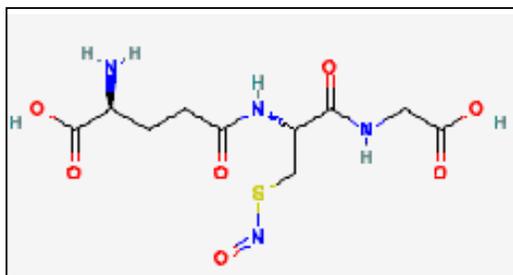


Figura 6: Estrutura do GSNO (Fonte: Pubchem, 2007)

Tem sido sugerido que a formação e decomposição de RSNO de baixo peso molecular, como o GSNO, deve representar um mecanismo para transporte e armazenamento de NO *in vivo*. É aceito que a decomposição de RSNO se dá pela quebra homolítica da ligação S-NO: $RSNO \rightarrow RS\cdot + NO\cdot$

Esta reação pode ser induzida por aquecimento, luz UV, presença de íons metálicos, superóxido e compostos contendo selênio. A maioria dos RSNO é instável a temperatura ambiente e decompõem-se automaticamente no dissulfeto correspondente e em NO. RSNO são fotossensíveis, a irradiação do GSNO com comprimentos de onda entre 340 e 545nm resulta na liberação de NO e do radical tiil. A decomposição de RSNO em solução pode ser catalisada por íons metálicos como Cu^+ , Fe^{2+} , Hg^{2+} e Ag^+ . Algumas enzimas contendo cobre, como a CuZn-SOD (cobre-zinco superóxido dismutase), também podem catalisar a decomposição de GSNO na presença de glutatona (WANG *et al.*, 2002; SINGH *et al.*, 1996). Um estudo utilizando ressonância paramagnética mediu a quantidade de NO liberado a partir do GSNO em solução aquosa, na presença de um agente quelante (EDTA). Este estudo demonstrou uma relação linear entre a liberação de NO e a concentração de GSNO, em todas as condições avaliadas a quantidade liberada de NO foi de 70 a 90% da concentração inicial (SHEU, ZHU e FUNG, 2000).

1.7 DEFESAS MICROBIANAS AO ESTRESSE NITROSATIVO

Quando o fungo entra em contato com o hospedeiro, ele deve interagir com as células efetoras do sistema imunológico e, para ter sucesso na colonização, deve resistir aos mecanismos microbicidas e microbiostáticos destas células. Estudos mostram que os microrganismos dispõem de defesas enzimáticas contra o estresse nitrosativo gerado pelo

hospedeiro, capazes de detoxificar o NO e as outras ERN por conversão em moléculas menos tóxicas (ULLMANN *et al.*, 2004; DE JESÚS-BERRÍOS *et al.*, 2003).

Em bactérias, o consumo de NO é realizado pela enzima flavorubredoxina óxido nítrico redutase em condições de anaerobiose ou microaerofilia, ou pela enzima flavohemoglobina denitrosilase em todas as condições. A flavohemoproteína foi primeiramente clonada em *E. coli* e a função desta família de enzimas na proteção contra o NO foi posteriormente elucidada tanto em *Salmonella enterica* quanto em *E. coli*. Esta enzima é encontrada, além de bactérias, também em fungos, mas não foi demonstrada em eucariotos superiores e transforma NO em nitrato (LIU *et al.*, 2000; ULLMANN *et al.*, 2004; DE JESÚS-BERRÍOS *et al.*, 2003).

Estudos de controle de expressão gênica realizados em *C. albicans* apontaram três homólogos da enzima flavohemoglobina denitrosilase, e resultados recentes demonstraram que uma delas é altamente induzida na resposta ao NO, mas não na resposta ao superóxido ou peroxinitrito (MISSALL, LODGE e McEWEN, 2004).

Em contraste com a flavohemoglobina, a GSNO redutase é conservada desde a bactéria até o homem e reduz GSNO à amônia e glutathiona dissulfeto (GSSG) (ULLMANN *et al.*, 2004; GODOY, GONZÁLEZ-DUARTE e ALBALAT, 2006; LIU *et al.*, 2001).

Os danos causados por ERN, em algumas circunstâncias, podem ser reparados. Assim a tioredoxina pode reduzir as pontes dissulfeto formadas nos grupamentos -SH dos resíduos de cisteína. Outro sistema de reparo importante, presente em bactérias, plantas, leveduras e mamíferos, é a ação da metionina sulfóxido redutase, que reduz metionina sulfóxido, gerada pela ação de ONOO⁻, à metionina (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

Embora os resíduos de metionina sulfóxido e pontes dissulfeto possam ser reparados, proteínas em que outros aminoácidos tenham sido oxidados ou nitrados podem apresentar danos irreversíveis e nestes casos freqüentemente ocorre a degradação proteolítica (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

Além das defesas enzimáticas, há também mecanismos de defesa não enzimáticos contra o estresse nitrosativo através de diversos metabólitos que são importantes seqüestradores de ERN. A glutathiona (GSH) tem demonstrado ser um importante mecanismo de proteção que reverte modificações protéicas induzidas por NO, este composto mantém o padrão dos grupamentos tióis em proteínas, por prevenir a oxidação de grupos SH em proteínas celulares ou pela redução de pontes dissulfeto induzidas pelo estresse, ela pode também quelar íons cobre diminuindo sua habilidade de gerar radicais livres, além de seqüestrar tais radicais. Outros metabólitos incluem a melanina, manitol e trealose. As

melaninas são polímeros multifuncionais encontrados na natureza que são conhecidos por reduzirem oxidantes e acredita-se que desempenham papel protetor na virulência dos fungos patogênicos humanos *C. neoformans*, *P. brasiliensis*, *W. dermatidis*, e *A. fumigatus*. Em *S. schenckii*, a DHN-melanina (tipo de melanina que possui o 1,8-dihidroxinaphtaleno como um dos intermediários da sua via sintética) confere proteção tanto aos radicais reativos de oxigênio quanto de nitrogênio. Nas concentrações comumente presentes nos tecidos, o ascorbato é um efetivo seqüestrador de ERN, incluindo o N_2O_3 , conseqüentemente, ele pode suprimir a formação de todas as ERN formadas a partir desta molécula. O ascorbato deve agir desestabilizando RSNO existentes ou, alternativamente, ele pode inibir a S-nitrosação por redução da concentração de radicais tiil (BRYAN *et al.*, 2004; MISSALL, LODGE e McEWEN, 2004; GUKASYAN *et al.*, 2003; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

Resistência a ERN e ERO está correlacionada com a virulência de isolados clínicos de *C. neoformans* (DE JESÚS-BERRÍOS *et al.*, 2003), *H. capsulatum* (NITTLER *et al.*, 2005), *C. albicans* (ULLMANN *et al.*, 2004), *Pneumocystis carini* (MISSALL, LODGE e McEWEN, 2004) e *Mycobacterium tuberculosis* (RHEE *et al.*, 2005).

1.8 HIBRIDAÇÃO EM MICROARRANJOS DE DNA

Estudos de expressão gênica diferencial são de grande importância, pois permitem identificar quais genes estão mais expressos ou suprimidos em uma determinada condição. Esses conhecimentos foram inicialmente adquiridos através de técnicas que analisavam as diferenças de expressão dos genes individualmente. A técnica de arranjos de DNA surgiu então, como uma ferramenta para monitorar a expressão gênica em larga escala, uma vez que permite avaliar simultaneamente o nível de expressão de milhares de genes, possibilitando a inferência de funções gênicas a partir da análise das variações globais observadas no transcriptoma da célula, revelando também interações entre diferentes vias de sinalização (HOFMANN, 2005).

Os arranjos de DNA são constituídos por suportes sólidos (matriz), como uma lâmina de vidro ou uma membrana, nos quais são fixadas, de forma ordenada uma grande quantidade de amostras de DNA. Existem basicamente dois tipos de arranjos: os macroarranjos ou “macroarrays” e os microarranjos ou “microarrays”. Nos macroarranjos, as amostras de DNA são distribuídas em membranas de nylon ou nitrocelulose e pode carregar amostras referentes

a até 2000 genes (SASAKI *et al.*, 2001). Já os microarranjos são usualmente, feitos em uma lâmina de vidro especial, semelhante àquelas utilizadas em microscopia óptica, e são capazes de carregar até 10.000 genes que são distribuídos por robôs (“arrayers”) de alta precisão, em um grau de compactação muito maior que os macroarranjos (CHEUNG *et al.*, 1999). O DNA pode ser depositado ou sintetizado diretamente no suporte e as amostras podem ser de DNA, DNA complementar (cDNA) ou oligonucleotídeos (SOUTHERN, MIR e SHCHEPINOV, 1999).

A produção de um microarranjo de DNA (também chamado “chip”, “biochip” ou “microchip”) começa pela seleção das amostras de DNA que irão formá-lo. Normalmente, microarranjos de eucariotos são construídos utilizando fragmentos de seqüências expressas (EST) do genoma, amplificados por PCR a partir de clones oriundos de uma ou mais bibliotecas de cDNA. Estes produtos de PCR são então purificados e fixados à matriz escolhida (**Figura 7**) (DUGGAN *et al.*, 1999).

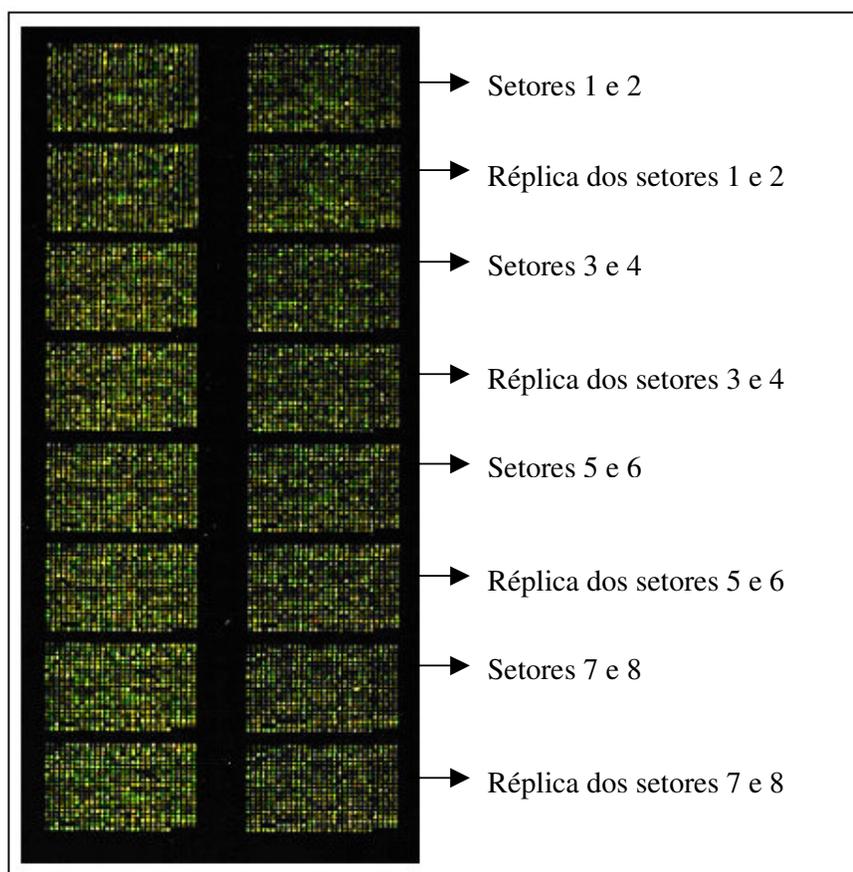


Figura 7: Arquitetura do chip de *P. brasiliensis* utilizado na hibridação competitiva em microarranjos de DNA. O chip carrega 4.692 seqüências representativas dos genes de *P. brasiliensis*, divididos em 8 setores e depositados em duplicatas. Estão assinalados os setores e suas respectivas réplicas, que foram dispostas imediatamente abaixo do setor correspondente.

A técnica de hibridação em microarranjos é baseada no princípio da complementaridade de bases do DNA e sua capacidade de ligar-se especificamente, ou hibridar, ao DNA molde do qual foi originado (SOUTHERN, MIR e SHCHEPINOV, 1999; TZOUVELEKIS, PATLAKAS e BOUROS, 2004). Utilizando um microarranjo contendo milhares de amostras de DNA, pode-se determinar, em um único experimento, o nível de expressão de milhares de genes de uma célula através da mensuração da quantidade de RNA mensageiro (mRNA) hibridado, sob a forma de cDNA, a cada posição ou “spot” do microarranjo (TZOUVELEKIS, PATLAKAS e BOUROS, 2004).

Em uma análise comparativa de expressão gênica, “pools” de RNAs extraídos de duas populações em estudo (teste e referência), são convertidos em cDNAs e marcados com diferentes fluoróforos. Os cDNAs podem competir durante a hibridação com o DNA do chip. Após a lavagem, para retirar o excedente de material, os híbridos podem ser detectados através da varredura por um “scanner”, usando comprimentos de onda capazes de detectar os sinais de excitação referentes aos dois fluoróforos separadamente. Quanto maior a expressão de um gene, em uma determinada condição, maior será a intensidade do sinal captada pelo “scanner” para um “spot” do microarranjo que contém a sequência deste gene.

Os dados são então transferidos para programas de computador que analisam e quantificam a intensidade de cada um dos “spots”, resultando em um gráfico de dispersão onde podem ser observados e destacados para uma análise mais aprofundada, os genes constitutivamente expressos, e os super e sub-regulados (**Figura 8**) (SASAKI *et al.*, 2001; DUGGAN *et al.*, 1999).

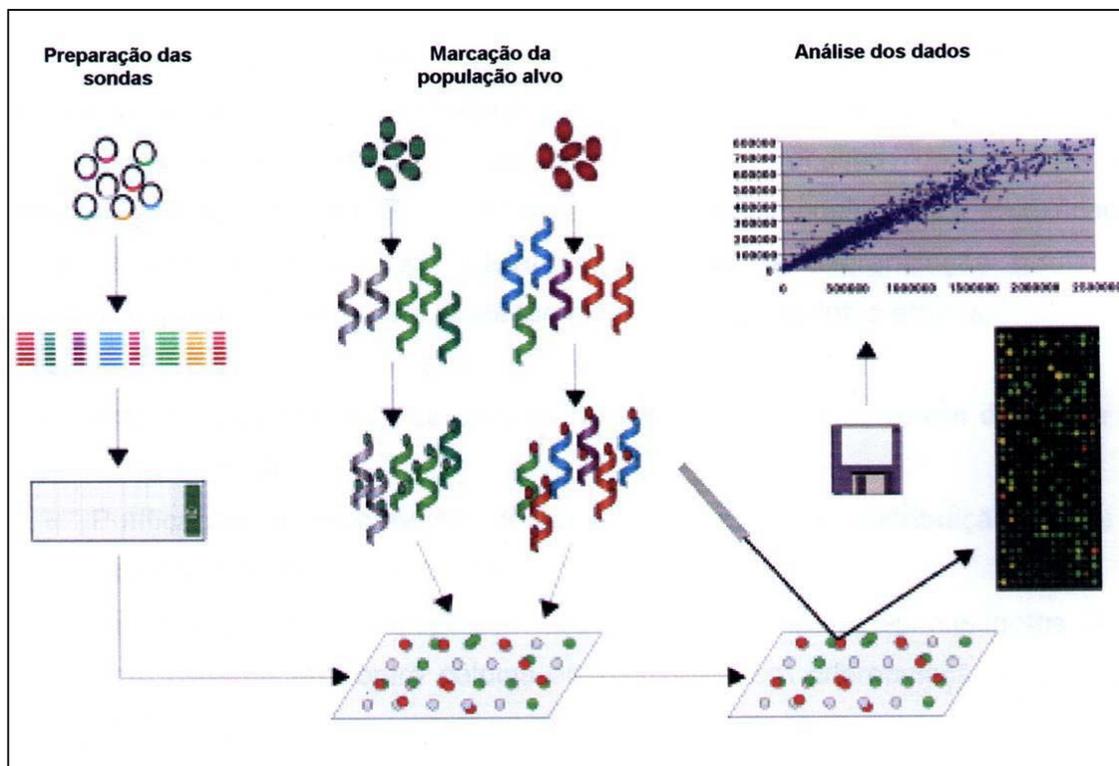


Figura 8: A metodologia de hibridação em microarranjos de DNA. O esquema mostra, à esquerda, o processo de preparação das sondas, que são amplificadas por PCR, a partir de bibliotecas gênicas, purificadas e distribuídas na superfície de lâminas de vidro para a fabricação dos microarranjos. Na parte central da figura, é possível ver a marcação das populações alvo de RNA (teste e referência) com dois fluoróforos diferentes, para a hibridação sobre o microarranjo; à direita, é mostrado o processo de obtenção das imagens, através de um “scanner” capaz de ler os comprimentos de onda referentes a cada fluoróforo e, por fim, a análise dos dados realizada por programas de computador. Fonte: adaptado de Moreira-Filho e Almeida (2007).

Até o momento, a resistência de *P. brasiliensis* ao estresse nitrosativo ainda não havia sido quantificada *in vitro* ou *in vivo* e a eventual existência de enzimas de resistência, com expressão especificamente modulada em resposta à presença de doadores de NO ainda não foi claramente definida. Desta forma, este estudo procura definir os níveis de resistência de células leveduriformes, a forma patogênica de *P. brasiliensis*, à presença de concentrações crescentes do doador de NO (GSNO), bem como verificar a expressão de possíveis genes envolvidos com a resistência a esta substância.

2 OBJETIVO

Identificar, por meio de hibridações com microarranjo de DNA, genes do fungo patogênico humano *Paracoccidioides brasiliensis* (isolado Pb18) que apresentem modulação de expressão frente à exposição do fungo a concentrações crescentes de S-nitrosoglutathione (GSNO), um agente liberador de NO.

3 MÉTODO

3.1 CULTIVO DE *Paracoccidioides brasiliensis*

Os experimentos foram realizados utilizando-se amostras do isolado 18 de *P. brasiliensis*, chamado Pb18, que corresponde a um isolado altamente virulento (SINGER-VERMES *et al.*, 1989). Estas culturas são mantidas em nosso laboratório na fase leveduriforme, por incubação a 35,5°C, em meio sólido YPD modificado, cuja composição é extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), dextrose 2% (p/v), Agar 2% (p/v), pH 6,3. O armazenamento é feito em refrigerador e as culturas são repicadas mensalmente para manutenção.

3.2 CURVA DE CRESCIMENTO DE *Paracoccidioides brasiliensis*

Para realizar a curva de crescimento do fungo uma cultura de células leveduriformes mantida em meio sólido, foi primeiramente transferida para 50mL do meio líquido, com o auxílio de uma alça de platina, e incubada a 35,5°C com agitação de 125 rpm por 6 dias, até que atingisse densidade óptica a 600 nm (D.O.₆₀₀) de aproximadamente a 2,0, que corresponde ao final da fase de crescimento exponencial do fungo. A partir desta cultura, um inóculo de 10% do volume final, foi adicionado a um novo meio YPD líquido, esta cultura foi incubada nas mesmas condições e as leituras de D.O.₆₀₀ foram realizadas a cada 24 horas, durante 7 dias.

3.3 ESTRESSE NITROSATIVO

Para estabelecer as concentrações ideais de GSNO na indução do estresse nitrosativo, foi realizada uma curva de crescimento do fungo em presença de concentrações crescentes deste agente. Para tanto, uma cultura de Pb 18 foi previamente inoculada conforme descrito

no item 3.2. A partir desta cultura, quatro culturas foram incubadas na presença de GSNO, cada uma recebeu uma quantidade suficiente do doador de NO para atingir uma concentração final de 0,5 mM, 1 mM, 5 mM e 10 mM, e uma quinta cultura foi mantida como controle (sem adição de GSNO). Estas culturas foram mantidas a 35,5°C com agitação de 125 rpm por 6 dias e o acompanhamento do crescimento do fungo foi realizado por leituras diárias de densidade óptica a 600nm (D.O.₆₀₀).

Com base nos resultados obtidos na curva de crescimento de *P. brasiliensis* na presença de GSNO, as concentrações de 0,5 mM, 1 mM e 5 mM foram escolhidas para o estabelecimento do estresse nitrosativo. Neste experimento, uma cultura de leveduras de Pb18, previamente inoculada conforme descrito no item 3.2, foi adicionada ao meio YPD líquido para perfazer um volume final de 150mL. Este inóculo foi incubado nas mesmas condições até que atingisse final da fase de crescimento exponencial. A cultura foi aliquoteada em quatro frascos, sendo que um deles foi utilizado como controle (sem adição do doador de NO) e as outras três culturas foram incubadas na presença de GSNO nas concentrações de 0,5 mM, 1 mM e 5 mM. Os frascos foram incubados a 35,5°C com agitação de 125rpm, permanecendo nesta condição por 6 horas. Decorrido este tempo, as amostras foram filtradas em sistema de vácuo e o “pellet” formado foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido, e mantido a -70°C para posterior extração do RNA.

3.4 EXTRAÇÃO DE RNA

Para a extração o sedimento celular foi triturado com nitrogênio líquido em gral de porcelana, em seguida colocado em 1 mL de Trizol (Invitrogen), contendo o mesmo volume de pérolas de vidro com diâmetro de 2 mm, seguido de agitação intensa em agitador de tubos tipo vórtex por 10 minutos. Após decantação das pérolas de vidro, o sobrenadante foi transferido para tubo plástico de 1,5 mL, e adicionado 200 µL de clorofórmio, o material foi novamente agitado em vórtex durante 15 segundos e posteriormente centrifugado a 15.300 g por 15 minutos. A fase aquosa foi, então, transferida para um novo tubo plástico de 1,5 mL, onde foi adicionado o mesmo volume de isopropanol absoluto gelado, este material foi mantido em -20°C por 12 horas, para precipitação. Decorrido este tempo, a amostra foi centrifugada a 15.300g por 30 minutos à 4°C, sendo o “pellet” formado lavado com etanol

70% (v/v) e seco em centrifuga a vácuo (“speed-vac”) por 10 minutos. A amostra foi ressuspensa com adição 200 µL de água e quantificada através de densidade óptica, lida em um espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000.

3.5 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO RNA OBTIDO

A avaliação da qualidade das amostras obtidas foi feita através de gel de agarose desnaturante 1% [agarose 1% (p/v), MOPS 10x 10% (p/v) e formaldeído 5% (v/v)]. Para a corrida foi utilizado 3 µg de RNA e completado o volume para 10 µL com tampão de amostra contendo brometo de etídio. As amostras foram desnaturadas por 10 minutos a 65°C. A corrida foi feita em 60 V durante 60 minutos. (Modificado de MONTE e SOMERVILLE, 2002).

3.6 PURIFICAÇÃO DO RNA

Após a extração, o RNA foi purificado utilizando-se RNeasy Mini Kit (50) (Quiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. Somente foram utilizados os RNAs que não apresentavam degradação visível no gel e cuja densidade óptica mostrasse uma razão D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀ entre 1,9 e 2,0. Esta etapa de purificação se faz necessária para a eliminação de pequenas quantidades de materiais como DNA e proteínas que possam ter permanecido na amostra, e conseqüente isolamento do RNA. O princípio da técnica baseia-se na afinidade da coluna, utilizada no kit, ao RNA que se fixa na resina, e os procedimentos de lavagem retiram os demais materiais. Esta purificação permite a obtenção de material com grau de pureza necessária para as marcações.

3.7 MARCAÇÃO DO cDNA PARA HIBRIDAÇÃO COMPETITIVA

Cada marcação foi realizada a partir de mRNA de células não tratadas, usado como referência em hibridações competitivas, contra mRNA derivado de células submetidas a cada tratamento com GSNO.

3.7.1 Síntese da Primeira Fita de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita partindo-se de 30 µg de RNA total (concentrado em 14 µL), no qual foi adicionado 4 µL de oligo dT 100 pmol (15 T na extremidade 3') para seleção do mRNA, 0,5 µL de primer λQ plus (10 µM) e 1 µL de RNA de λQ (20 ng/µL) como controle positivo da marcação, perfazendo um volume total de 19,5 µL. A amostra foi submetida a desnaturação a 70°C por 10 minutos, seguida de anelamento em temperatura ambiente durante 10 minutos, quando então, foi adicionado 6 µL de tampão de primeira fita 5X (Invitrogen), 3 µL DTT (0,1 M), 0,6 µL dNTPs (25 mM de cada dNTP), 1 µL de Superscript II RT (200 U/µL – Invitrogen). A reação foi incubada a 42°C por 2 horas, período após o qual, foi realizado a degradação do RNA remanescente, bem como do RNA molde com 1 µL de RNase A (10 mg/mL) mantendo-se a reação a 37°C por 30 minutos. A segregação do cDNA dos demais materiais foi feita utilizando-se Microcon YM-30 (Millipore) e o volume ajustado para 21 µL.

3.7.2 Síntese da Segunda Fita de cDNA

O cDNA contido nos 21 µL obtidos na síntese da primeira fita foram desnaturados a 95°C durante 5 minutos seguido da adição de 20 µL de solução de iniciadores randômicos 2,5X (BIOPRIME DNA Labelling System[®] – Invitrogen), 5 µL de dNTPs mix (dATP 24 mM, dTTP 24 mM, dGTP 24 mM e dCTP 12 mM), 1 µL Klenow 40 U/µL (BIOPRIME DNA Labelling System[®] – Invitrogen), 2 µL de Fluorolink[®] Cy3 dCTP ou Cy5 dCTP 25nmol

(Amersham). A reação foi incubada em banho-maria a 37°C por 2 horas, e sua purificação feita em Microcon YM-30 (Millipore) através de 3 lavagens consecutivas, sendo utilizada em cada uma delas 400 µL de H₂O MilliQ autoclavada. A amostra foi concentrada até 14 µL. O mesmo procedimento foi realizado tanto para a amostra controle quanto para a amostra tratada com GSNO, excetuando-se na adição do fluoróforo, cuja adição deve ser diferente entre as duas amostras, ou seja, em uma adicionou-se Cy3 e na outra Cy5. As duas amostras foram misturadas e a incorporação de ambos os fluoróforos medida em espectrofotômetro NanoDrop[®] ND-1000 e o volume final foi completamente seco em centrifuga a vácuo (“speed vac”).

Para cada condição experimental testada (diferentes concentrações de GSNO), foram realizadas duas marcações com inversão de fluoróforos (“Dye Swap”), ou seja, na primeira marcação utilizou-se Cy3 para a amostra controle e Cy5 para a amostra tratada com uma das três concentrações de GSNO, e na segunda marcação usou-se Cy5 na amostra controle e Cy3 em uma das amostras que sofreu o estresse nitrosativo.

3.8 HIBRIDAÇÃO

A hibridação foi realizada utilizando biochips carregando seqüências representativas de aproximadamente 4692 genes de *P. brasiliensis*, que foi construído pelo Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do NIB (Núcleo Integrado de Biotecnologia) da Universidade de Mogi das Cruzes. O procedimento foi realizado adicionando-se ao cDNA marcado 100 µL de solução de hibridação cuja composição é a seguinte: 6X SSC, 5X Denhardt's, 0,25 mg/mL de DNA de esperma de salmão, SDS 0,5% (p/v), formamida 50% (v/v) e poli dT 925 ng/mL (25 U - Amersham). Esta solução contendo o cDNA foi desnaturada a 95°C por 5 minutos. Decorrido o tempo necessário para a desnaturação, o cDNA foi hibridado contra o biochip de *P. brasiliensis* por um período de 14 horas a 42°C, em uma estação de hibridação GeneTac (Genomic Solutions).

Após a hibridação procedeu-se a lavagem, em que cada etapa foi repetida por duas vezes, sendo a primeira realizada com solução de média estringência contendo 0,5X SSC e SDS 0,01% (p/v), na segunda foi utilizado solução de alta estringência constituída de 0,06X SSC e SDS 0,01% (p/v) e mais duas lavagens finais em solução com 0,06X SSC. As lavagens também foram realizadas na estação de hibridação GeneTac (Genomic Solutions) e cada etapa

consistiu de 1 minuto de fluxo, seguido de 5 minutos de incubação sem agitação, a 25°C. Ao final, o biochip hibridado foi seco por centrifugação durante 2 minutos a 106g.

3.9 AQUISIÇÃO E ANÁLISE DE IMAGENS

A leitura do biochip hibridado foi realizada utilizando-se de um scanner óptico Affymetrix 418, nos comprimentos de onda 532 nm (Cy3) e 635 nm (Cy5) gerando imagens independentes para cada um dos fluoróforos. Os genes de *P. brasiliensis* estão “spotados” no biochip em duplicata, e como para cada concentração de GSNO foram feitas duas marcações independentes com inversão dos fluoróforos (“Dye Swap”), totalizou-se 8 leituras para cada “spot”. Para cada leitura, a potência do laser e o ganho do fotomultiplicador foram ajustados para minimizar o “background” e evitar saturação de sinal em diferentes “spots” do biochip.

A análise da imagem de cada par de experimentos (controle x amostra teste) foi realizada pelo programa TIGR Spotfinder v.3.1.0 que delimita a área de cada “spot” a partir da imagem bruta através da criação de um grid (SAEED *et al.*, 2003). A quantificação dos valores de intensidade de cada “spot” foi calculada através de um algoritmo de segmentação de histograma, em que a intensidade de sinal dos “pixels” de cada “spot”, assim como os valores de “background local”, são identificados e quantificados, gerando um valor integrado de intensidade de sinal que desconta o “background”. Nesta análise foram excluídos os “spots” que não possuíam intensidade equivalente ao “background” local mais dois desvios-padrão, e estes dados foram salvos em uma planilha com a extensão .mev. Nesta planilha, foram compiladas todas as informações sobre as intensidades das leituras, background local, além de informação sobre a identificação de cada “spot” presente no microarranjo, incluindo “links” que permitem acessar o GeneBank ou outros bancos de dados para ter acesso a informações detalhadas a respeito de cada gene.

Os valores de intensidade obtidos foram submetidos a uma série de transformações matemáticas através do programa TIGR Midas v.2.19. (SAEED *et al.*, 2003) e os dados foram filtrados de maneira a excluir “spots” que possuísem valores integrados inferiores a 10.000 unidades análogo-digitais. Após, as intensidades dos dois canais (Cy3 e Cy5) foram normalizadas pelo algoritmo matemático Lowess (WORKMAN *et al.*, 2002), de regressão não-linear, que utiliza fatores de normalização intensidade-dependentes para diferentes “spots”, de acordo com a intensidade de seus respectivos sinais. As variações nos valores de

expressão em cada setor do biochip foram então equalizadas, utilizando-se a opção de regularização de desvio-padrão (Block Mode) (DUDOIT *et al.*, 2002).

3.10 GERENCIAMENTO DE BANCOS DE DADOS E IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

As planilhas contendo os dados finais das análises foram carregadas em um outro programa do pacote TIGR denominado “Multi Experiment Viewer” (MEV) v. 3.1 onde foi feita a normalização entre os experimentos e a análise de variância (ANOVA) entre os grupos, utilizando-se valor de $P = 0,01$ como limite de confiabilidade para identificar genes com variação de expressão estatisticamente significativa. Em seguida, os genes foram agrupados com o auxílio dos algoritmos de clusterização hierárquica, “K-means”, a fim de permitir a visualização daqueles genes super e sub-regulados durante a resposta ao estresse nitrosativo. Todos os softwares empregados nestes estudos, bem como detalhes referentes à sua utilização podem ser obtidos em <http://www.tigr.org/software>.

3.11 CONFIRMAÇÃO DOS DADOS DE MICROARRANJO POR RT-PCR EM TEMPO REAL

Para confirmação dos dados obtidos pela técnica de microarranjo de DNA, amostras dos mesmos RNA utilizados nas hibridações foram submetidas a experimentos de RT-PCR em tempo real.

A síntese de cDNA foi feita partindo-se de 3µg de RNA total, no qual foi adicionado 4 µL de oligo dT 100 pmol (15 T na extremidade 3') para seleção do mRNA e água milliQ em quantidade suficiente para completar o volume da reação para 19 µl. A amostra foi submetida a desnaturação a 70°C por 5 minutos, seguida de anelamento em temperatura ambiente durante 10 minutos, quando então, foi adicionado 6 µL de tampão de primeira fita 5X (Invitrogen), 3 µL DTT (0,1 M), 0,6 µL dNTPs (25 mM de cada dNTP), 1 µL de Superscript II RT (200 U/µL – Invitrogen). A reação foi incubada a 42°C por 2 horas, período após o qual,

foi processada a degradação do RNA remanescente, bem como do RNA molde com 1 μ L de RNase A (10 mg/mL) mantendo-se a reação a 37°C por 30 minutos. A purificação foi realizada em Microcon YM-30 (Millipore).

A partir do resultado obtido nas hibridações em microarranjo, 10 genes foram selecionados, para confirmação da expressão por RT-PCR em tempo real. Para cada gene quantificado foi utilizado 50 ng de cDNA, de cada condição (sem tratamento e após a exposição as três concentrações de GSNO), 50 nM de cada iniciador (“Forward” e “Reverse”) e 10 μ L de SYBR Green PCR Máster Mix 2X (Applied Biosystems) em reação com volume final de 20 μ L.

Todos os experimentos foram acompanhados de controles negativos (sem adição de cDNA) utilizando-se o mesmo procedimento. Todas as reações foram feitas em triplicata. As reações de amplificação foram realizadas no aparelho *ABI Prism® 7500 Real time PCR System* (Applied Biosystems), nas condições indicadas pelo fabricante.

Para corrigir quantidades iniciais de cDNA, das diferentes amostras, foi usado como normalizador, um gene sem função conhecida, cuja seqüência de nucleotídeos pode ser verificada em <http://143.107.203.68/marrayv2/mias.html> (MAS 1659) (NUNES *et al.*, 2005). A escolha deste gene foi devida sua expressão constitutiva em todas as situações, que é caracterizada pela expressão deste gene, mas sem variação entre as várias situações analisadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CRESCIMENTO DE *Paracoccidioides brasiliensis* EM PRESENÇA DE GSNO

Para estabelecer as concentrações de trabalho de GSNO como indutor do estresse nitrosativo foi realizada a curva de crescimento do *P. brasiliensis* em presença de concentrações crescentes desta droga (**figura 9**). Neste experimento, as células leveduriformes do fungo foram cultivadas em meio YPD até que se atingisse densidade óptica a 600 nm (D.O.₆₀₀) de aproximadamente 2, que corresponde ao final da fase de crescimento exponencial do fungo. A partir desta cultura foram inoculadas cinco amostras numa concentração de 10% da cultura original. Quatro amostras foram tratadas com GSNO em concentração final de 0,5 mM, 1 mM, 5 mM e 10 mM, e a quinta amostra, não tratada, mantida como controle. O efeito do estresse nitrosativo no crescimento foi medido espectrofotometricamente (D.O.₆₀₀) com leituras a cada 24 horas, durante 7 dias.

Pode-se observar que as doses de 0,5 mM, 1 mM e 5 mM apresentam efeitos inibitórios dose-dependente na taxa de crescimento, que se tornou evidente nas primeiras horas do tratamento. Quando tratado com 0,5 mM e 1 mM houve uma pequena diminuição no crescimento das culturas, quando comparado com o controle. Na exposição a 5 mM de GSNO houve uma acentuada diminuição na taxa de crescimento principalmente nos tempos iniciais de tratamento, podendo ser observado um aumento da fase de adaptação, e a recuperação nestas condições só foi verificada a partir do sexto dia de incubação. Já a concentração de 10 mM levou a uma severa mudança na taxa de crescimento. Estes resultados ajudaram a determinar a resposta da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* a diferentes concentrações de GSNO.

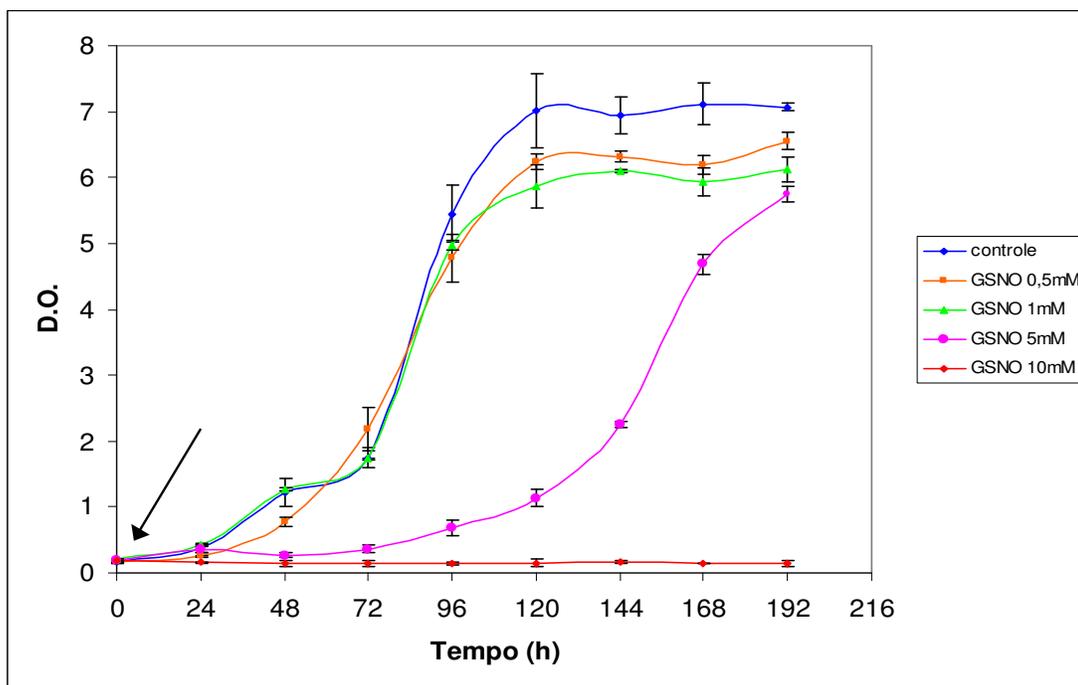


Figura 9: Curva de crescimento de *Paracoccidioides brasiliensis* em meio YPD na presença de GSNO. Uma cultura de *P. brasiliensis* foi aliquoteada em cinco frascos, um deles foi utilizado como controle (sem adição de GSNO) e as outras quatro culturas foram acrescidas de GSNO nas concentrações finais de 0,5 mM, 1 mM, 5 mM e 10 mM. Os frascos foram incubados a 35,5°C, sob agitação de 125 rpm. A taxa de crescimento foi medida espectrofotometricamente em 600nm (D.O.₆₀₀) com leituras a cada 24 horas, durante 7dias. A seta indica o momento em que foi adicionado GSNO nas culturas (t=0).

A partir destes dados definiu-se as concentrações de 0,5 mM, 1 mM e 5 mM para serem usadas nos experimentos de hibridação em microarranjo de DNA. Como o objetivo deste trabalho era observar a expressão gênica do fungo em resposta a estresse nitrosativo *in vitro* era essencial trabalhar em situações em que as células ainda se mostravam capazes de sobreviver ao tratamento.

Após o estabelecimento das doses a serem utilizadas, uma nova cultura de leveduras de *P. brasiliensis* foi inoculada em 150 mL de meio YPD líquido por 5 dias (crescidas até atingir o final da fase exponencial). Esta cultura foi então dividida em quatro frascos, um dos frascos foi utilizado como controle e os outros três receberam doses de GSNO para que atingissem a concentração final de 0,5 mM, 1 mM e 5 mM. A exposição ao agente foi de 6 horas, tempo após o qual se procedeu a filtração a vácuo para separação das células do meio de tratamento. O precipitado formado foi utilizado para extração de RNA, em que a lise celular foi feita por trituração em gral na presença de nitrogênio líquido, seguido de agitação intensa com pérolas de vidro e a extração do RNA, conforme descrito no item 3.4 de Materiais e Métodos.

A qualidade do RNA extraído foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose desnaturante (1%), em que o critério para avaliação de sua integridade foi a presença das bandas 18S e 28S do RNA ribossomal intactas.

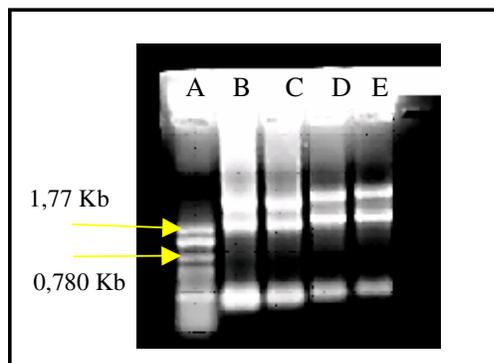


Figura 10: Análise do padrão de migração de RNAs de *P. brasiliensis* extraídos após exposição a GSNO nas concentrações de 0,5mM, 1mM e 5mM. A figura mostra um gel de agarose desnaturante (agarose 1%, MOPS 10x 10% e formaldeído 5%) com 3µg de RNA total em tampão de amostra contendo brometo de etídio. A: Marcador (RNA Ladder 0,16 - 1,77 Kb – Invitrogen); B: RNA controle (*P. brasiliensis* sem exposição ao GSNO); C, D e E correspondem aos RNAs de *P. brasiliensis* após exposição a GSNO nas concentrações de 0,5 mM, 1 mM e 5 mM, respectivamente. As setas indicam as bandas de 1,77Kb e de 0,780 Kb do RNA utilizado como marcador.

Como pode ser observado na **figura 10** as amostras apresentaram qualidade satisfatória, com as bandas 18S e 28S preservadas. Este material foi, então, purificado com o Kit RNeasy Mini (Quiagen), e quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000. Nesta leitura foi utilizado a razão das leituras 260nm / 280nm como parâmetro para avaliação do grau de contaminação do RNA por proteínas, e as amostras que apresentaram razão entre 1,9 e 2,0 foram utilizadas para obtenção de cDNA marcado.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

Para cada cultura exposta a diferentes concentrações de GSNO foram realizadas duas marcações independentes. Cada marcação foi realizada a partir de mRNA de células não tratadas usado como referência em hibridações competitivas contra mRNA derivado de células submetidas a cada tratamento com GSNO. Para cada condição experimental testada (diferentes concentrações de GSNO), foram realizadas duas marcações com inversão de fluoróforos (“Dye Swap”), ou seja, na primeira marcação utilizou-se Cy3 para a amostra controle e Cy5 para a amostra tratada com uma das três concentrações de GSNO, e na

segunda marcação usou-se Cy5 na amostra controle e Cy3 na tratada. As hibridações foram realizadas em um período de 14 horas a 42°C, em uma estação de hibridação GeneTac (Genomic Solutions), decorrido este tempo procedeu-se a lavagem, com solução de média estringência, seguida de alta estringência e lavagem final em solução com 0,06X SSC. O biochip hibridado foi lido utilizando-se um scanner óptico Affymetrix 418, nos comprimentos de onda 532 nm (Cy3) e 635 nm (Cy5) gerando imagens independentes para cada um dos fluoróforos. Como os genes de *P. brasiliensis* estão presentes no biochip em duplicata, totalizou-se 8 leituras para cada “spot”, sendo 4 leituras de cada condição (controle ou tratamento).

Os dados obtidos foram analisados para separação dos genes com expressão estatisticamente significativa daqueles com variação não estatisticamente significativa. Esta análise resultou na seleção de 751 genes diferencialmente modulados significativamente após análise de variância (ANOVA), utilizando-se valor de $P = 0,01$ como valor de corte. A **figura 11** abaixo apresenta as médias estatísticas das réplicas de cada experimento mostrando o perfil de expressão destes genes.

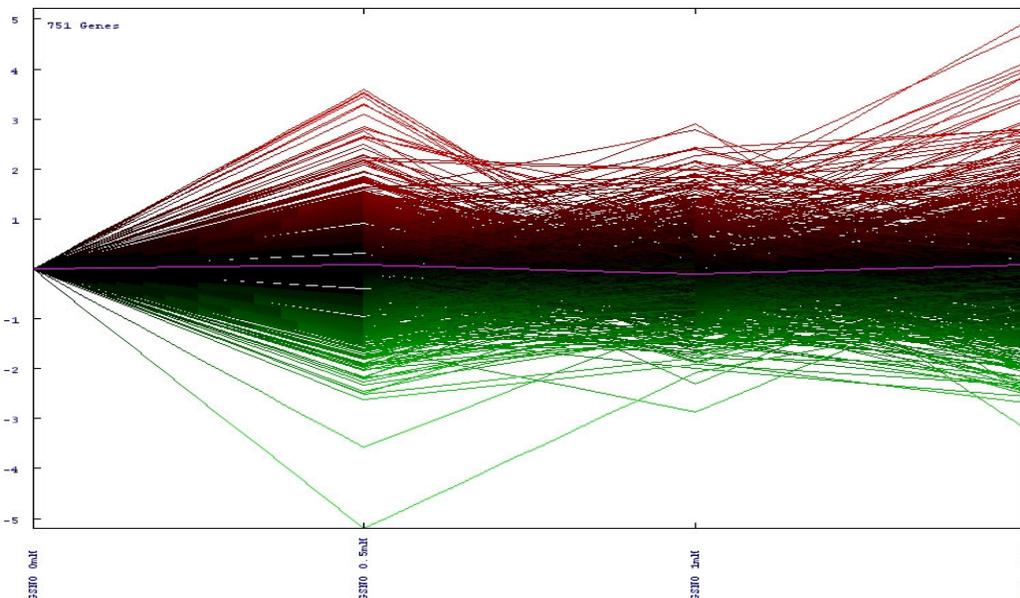


Figura 11: Representação dos 751 genes com variação na expressão estatisticamente significativa, após a exposição a GSNO 0,5mM, 1mM e 5mM. No eixo y a escala mostra o logaritmo na base 2 da razão das intensidades de Cy5/Cy3; no eixo x, são mostradas as diferentes concentrações de GSNO.

A variação em relação as diferentes doses é mostrada em função do logaritmo na base 2 da razão média das intensidades de fluorescências entre Cy5 e Cy3. As diferentes réplicas

dos experimentos foram normalizadas para que a intensidade de fluorescência em Cy3 corresponda às amostras não tratadas (controles) e a intensidade de Cy5, às amostras tratadas com GSNO. Dessa forma, quando o resultado do logaritmo é menor do que zero ($Cy3 > Cy5$), indica um gene com sua expressão diminuída (ou sub-regulada) pelo tratamento, a representação é na cor verde, sendo esta mais intensa, quanto maior for a sub-regulação deste gene; quando o logaritmo é maior do que zero ($Cy3 < Cy5$), indica um gene com sua expressão aumentada (ou super expresso) a cor é vermelha, aumentando de intensidade proporcionalmente ao aumento da super expressão do gene.

Para a análise dos genes que apresentaram modulação estatisticamente significativa foi feita a “clusterização” dos mesmos de acordo com o seu perfil de expressão.

Inicialmente para definir o número ideal de “clusters” foi feita uma análise através de um algoritmo conhecido como “figura de mérito” (FOM – “Figure Of Merit”). O algoritmo FOM é calculado considerando a variação média entre os valores de cada linha de super expressão e sub-regulação de um “cluster”. O operador indica, no programa, o número máximo de agrupamentos a serem calculados. O algoritmo divide, então, os genes em números crescentes de “clusters”, começando por um e chegando ao número máximo fornecido pelo operador, agrupando-os por suas semelhanças na variação de expressão. Em seguida, são calculadas as variações da expressão entre os genes que ficaram em cada agrupamento, e assim computada a média entre as variações de cada grupo, para cada situação (um grupo, dois grupos, três grupos, etc.). Com o aumento do número de “clusters”, a variação média de expressão entre os genes de cada um diminui. Estes dados são plotados em um gráfico com a média da variação de expressão entre os genes no eixo y e o número de “clusters” no eixo x (**figura 11**). Cabe então ao operador selecionar o número ideal de grupos, a partir do qual a variação média na expressão entre os genes não diminui significativamente.

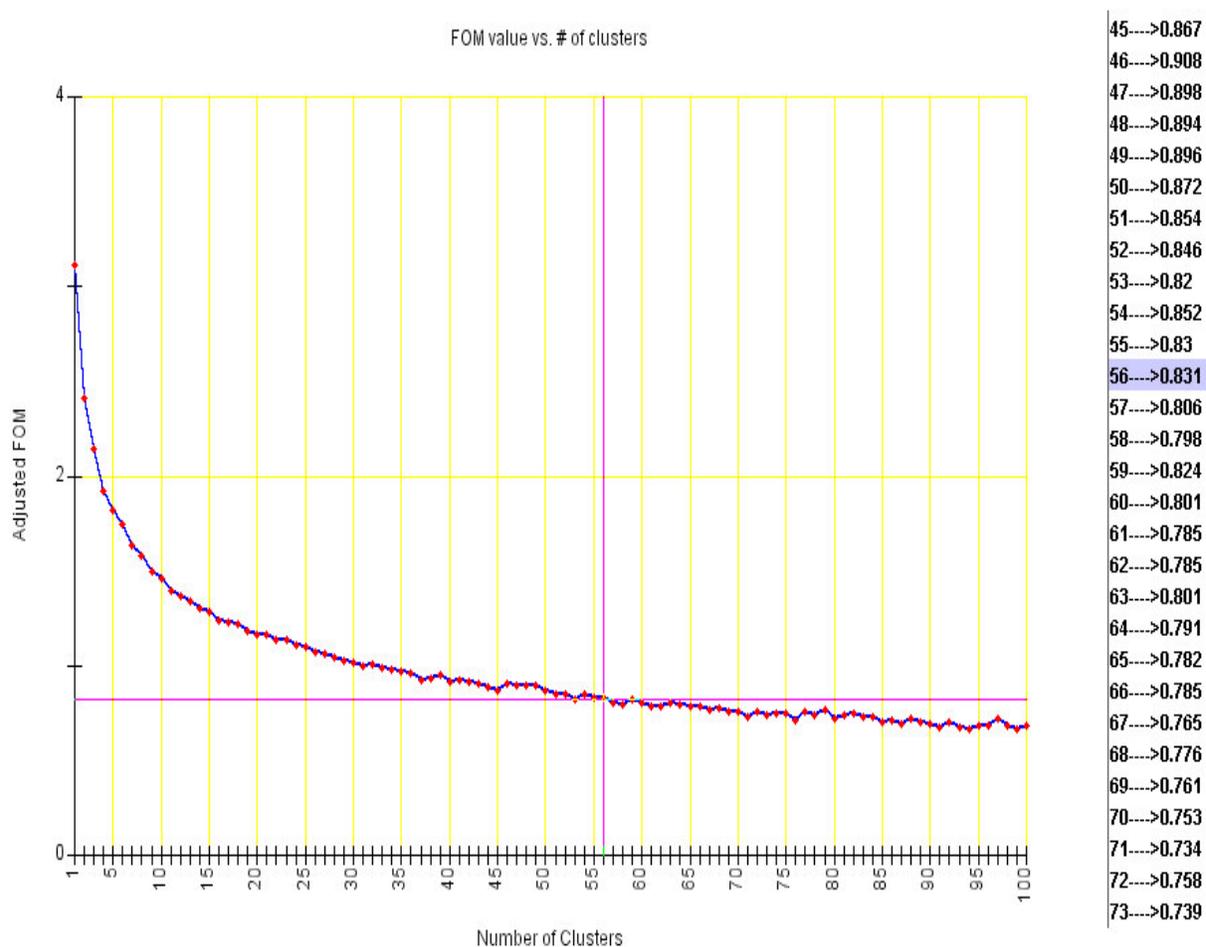


Figura 12: Gráfico gerado pelo algoritmo FOM. O valor representado no eixo y é a média entre as variações de expressão dos genes localizados em cada “cluster”. No eixo x, está o número de “clusters” de 1 a 100. Na coluna, à direita, é apresentada uma lista com os números de “clusters” em ordem crescente, e o valor médio obtido da variação de expressão entre os genes de cada um. Em destaque, na coluna, o número de “clusters” selecionado pelo operador, mostrado no gráfico pelo cruzamento das ordenadas em rosa.

Como mostra a **Figura 12**, através da análise da figura de mérito foi escolhido agrupar os genes em 56 “clusters”. Em seguida, foi realizada a clusterização hierárquica com o auxílio do algoritmo “K-means”, que agrupou os 751 genes nos 56 “clusters” divididos de acordo com seus padrões de expressão (**Figura 13**).

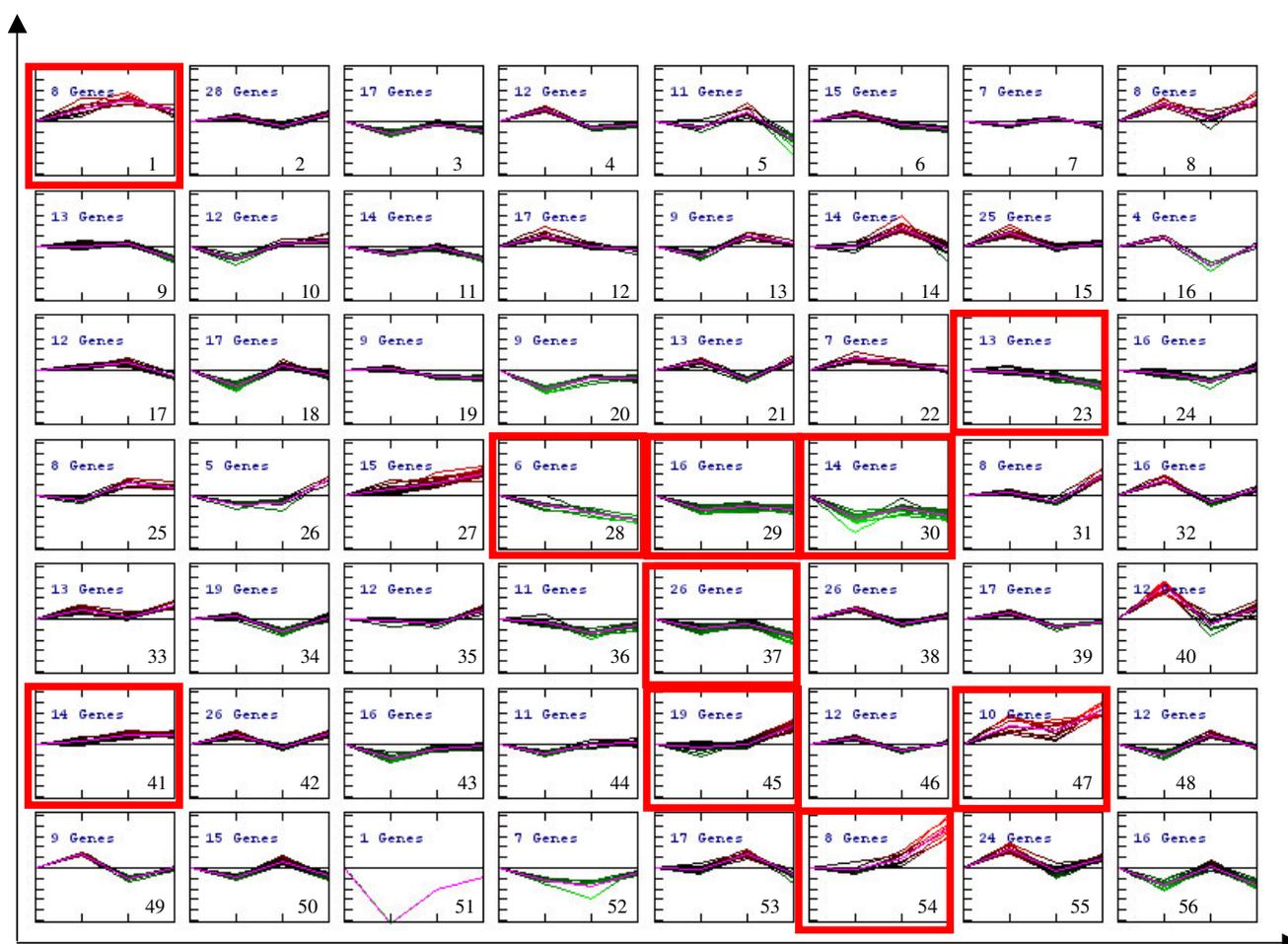


Figura 13: Agrupamento de 751 genes com variação estatisticamente significativa, totalizando 56 “clusters”. Cada “cluster” é formado por genes com variações semelhantes na expressão, em exposição a diferentes concentrações GSNO. No eixo y a escala mostra a variação para cada “cluster” do logaritmo na base 2 da razão das intensidades de Cy5/Cy3. No eixo x, são mostradas as diferentes concentrações de GSNO. A disposição dos experimentos foi feita da seguinte forma: no ponto inicial do eixo x, estão os dados de GSNO 0mM (controle), seguidos pelos de 0,5 mM, 1 mM e 5 mM respectivamente. Destacados em vermelho 10 “clusters” que serão analisados individualmente. A numeração na parte inferior direita indica a ordem de cada “cluster”.

Os “clusters” destacados na **figura 13** foram escolhidos para análise, por apresentarem o perfil de expressão dos genes com maior variação (super expressão ou sub regulação), em resposta ao estresse sofrido pelo fungo. A análise de tais “clusters” também se mostra interessante por apresentar, em sua maioria, genes com resposta dependente da dose de tratamento.

A análise individual dos genes foi detalhada nas **figuras 14 a 22**. A parte superior de cada figura mostra a escala de cores usada.

Deve destacar-se que dentre os 751 genes que foram selecionados por apresentarem modulação estatisticamente significativa, 405, que corresponde a 54%, são genes que não

possuem função conhecida (“no hits found”) e proteínas hipotéticas, o que poderá ser observado nas figuras acima citadas.

A seguir estão apresentados os “clusters” que apresentam um padrão de sub regulação nas três concentrações de GSNO utilizadas. Dentre os genes que apresentaram expressão sub-regulada destaca-se a presença de vários genes de proteínas ribossomais. Este padrão de resposta também pode ser observado em *C. albicans*, em que 1/3 dos genes sub regulados em resposta ao estresse nitrosativo, induzido pelo doador de NO Dipropilenotriamina NONOate (DPTA NONOate), corresponderam a proteínas ribossomais (HROMATKA, NOBLE e JOHNSON, 2005). A repressão de genes ribossomais também foi observada em *C. albicans* após fagocitose por macrófagos (LORENZ, BENDER e FINK, 2004), e em *S. cerevisiae* após a exposição a vários tipos de estresse, incluindo o nitrosativo, tendo sido caracterizado como parte da resposta ao estresse neste organismo (HORAN, BOURGES e MEUNIER, 2006; HROMATKA, NOBLE e JOHNSON, 2005). Em *P. brasiliensis* os vários genes que codificam para proteínas ribossomais estão destacados em vermelho nas **figuras 14 a 17**.

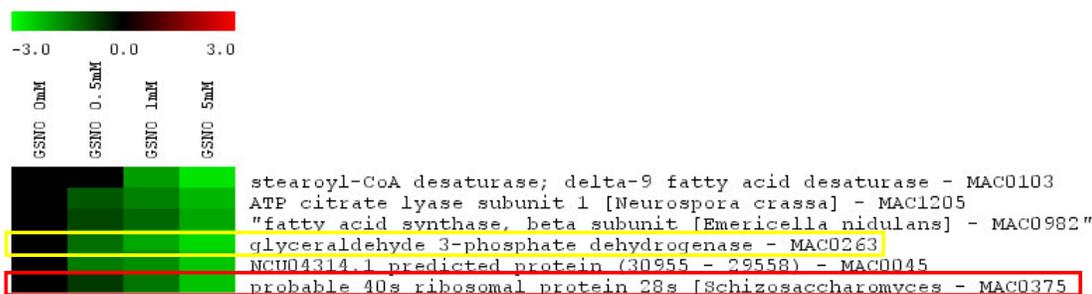


Figura 14: Cluster 28. Destacado em amarelo a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e em vermelho um gene putativo de proteína ribossomal.

Os genes apresentados no “cluster” 28 (**figura 14**) possuem expressão diminuída em resposta a todas as concentrações de GSNO. Pode-se observar o gene da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, que participa da via glicolítica e recicla o NAD^+ a NADH (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Os dados mostrados na **figura 14** estão de acordo com o resultado obtido por Sahoo, Sengupta e Ghosh (2003) que estudaram o efeito do GSNO na enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase nas leveduras *Rhodotorula mucilagenosa* e *S. cerevisiae*, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e demonstraram inibição de 30-35 % da atividade desta enzima para os dois microrganismos.

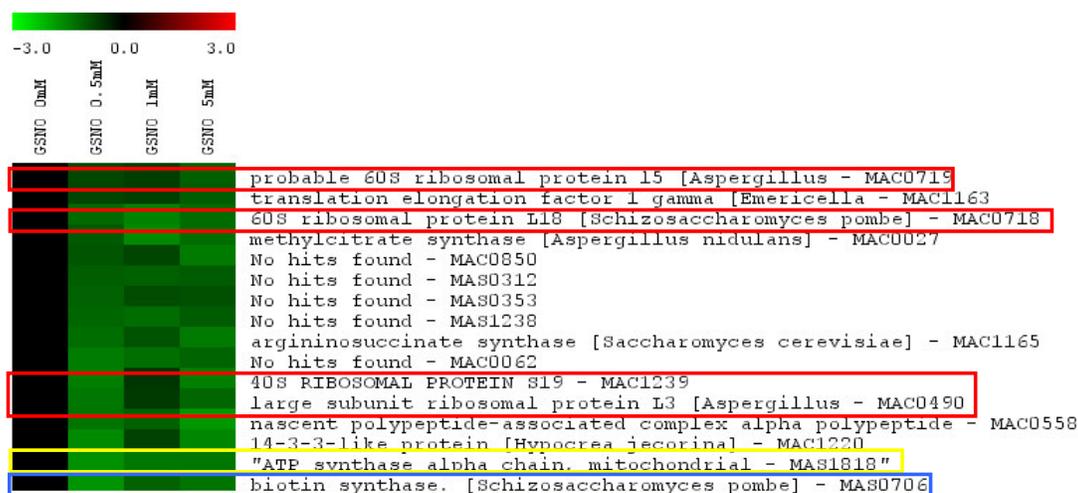


Figura 15: Cluster 29. Destacado em vermelho observa-se a presença de quatro genes de proteínas ribossomais, e em amarelo um gene da cadeia alfa da ATP sintase.

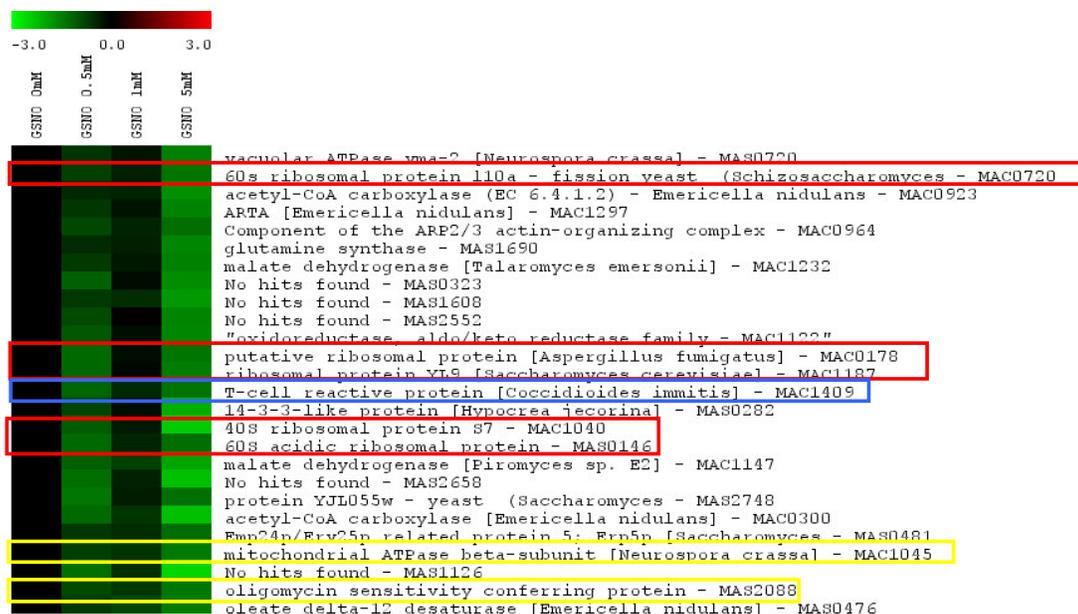


Figura 16: Cluster 37. Verifica-se a presença de quatro genes de proteínas ribossomais (destacadas em vermelho) e dois genes da ATP sintase, o da subunidade beta e o da proteína que confere sensibilidade a oligomicina (destacados em amarelo). Em azul está indicado o gene da “T-cell reactive protein”.

Três genes da ATP sintase apresentaram expressão diferencial: no cluster 29 (**figura 15**) observa-se a sub-regulação do gene que codifica a cadeia alfa e no cluster 37 (**figura 16**) o da subunidade beta e da proteína que confere sensibilidade a oligomicina. A sub-regulação de genes de ATP sintase foi recentemente relatada após a super expressão da NOS em neurônios (MONTE *et al.*, 2007). Em microrganismos têm sido demonstrada a inibição de

genes da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, por doadores de NO, como foi verificado em *S. cerevisiae* (HORAN, BOURGES e MEUNIER, 2006) e em *C. albicans*, relatado por Hromatka, Noble e Johnson (2005) em trabalho que mostrou a sub-regulação de genes que codificam para várias proteínas da cadeia transportadora, após exposição ao doador de NO DPTA NONOate. Em microrganismos, porém, o estudo do estresse nitrosativo em diversas espécies, tanto bactérias quanto fungos, ainda não havia demonstrado a inibição da ATP sintase (HORAN, BOURGES e MEUNIER, 2006; MISSALL *et al.*, 2006; FAN *et al.*, 2005; HROMATKA, NOBLE e JOHNSON, 2005; NITTLER *et al.*, 2005; FIROVED *et al.*, 2004; ULLMANN *et al.*, 2004). Os genes destacados em azul, biotina sintase e 4HPPD (designada como “T-cell reactive protein”) também foram moduladas em *P. brasiliensis* em resposta ao estresse oxidativo, apresentando-se sub-reguladas frente a exposição a H₂O₂ e super expressas após tratamento com Paraquat[®] (dados não publicados).

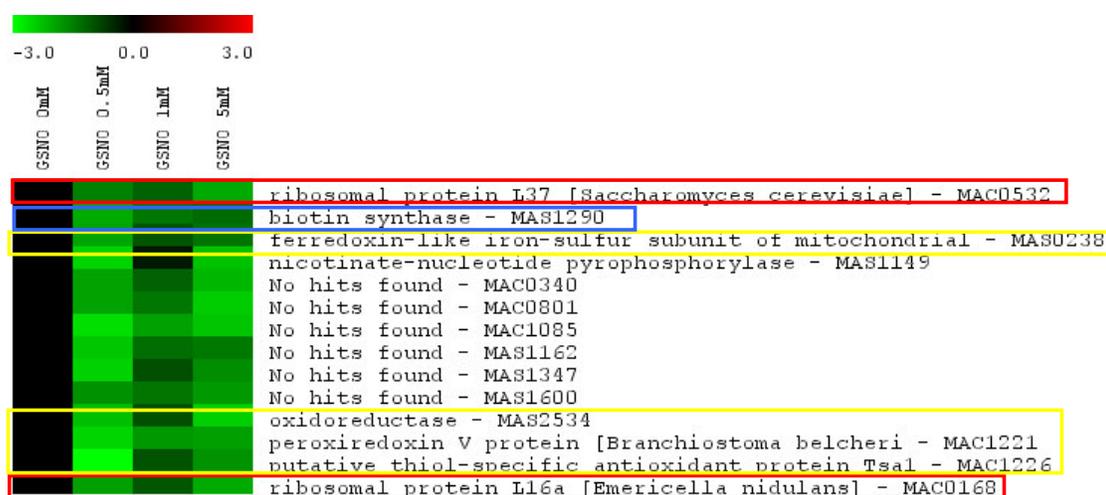


Figura 17: Cluster 30. Verifica-se a presença de dois genes que codificam para proteínas ribossomais (destacado em vermelho). Pode-se observar também, destacados em amarelo, os genes de ferredoxina, oxidoreductase, peroxirredoxina e da enzima antioxidante tiol-específica (TSA). Em azul está destacado o gene de biotina sintase que teve a expressão confirmada por RT-PCR em tempo real.

Verifica-se, na **figura 17**, a sub regulação de genes de enzimas com reconhecida atividade antioxidante. Moléculas como peroxirredoxina, tioredoxina e tióis de baixo peso molecular podem atuar na defesa ao estresse nitrosativo (SAHOO, SENGUPTA e GHOSH, 2003). Em *Cryptococcus neoformans* a TSA1 parece ser importante para a resistência do fungo ao estresse nitrosativo, uma vez que mutantes desta enzima mostram-se sensíveis ao NO (MISSALL *et al.*, 2005; MISSALL, PUSATERI e LODGE, 2004). A super expressão desta enzima também foi observada em *C. albicans* na resposta ao estresse nitrosativo

(HROMATKA, NOBLE e JOHNSON, 2005). A família das ferredoxinas compreende várias proteínas que estão envolvidas em vários processos redox, como redução do nitrito ou sulfito e oxidorredução das tiorredoxinas que são necessárias para a formação e quebra das pontes dissulfeto (LANGE *et al.*, 2000). O perfil de expressão apresentado na **figura 17** sugere que em *P. brasiliensis* estes genes não sejam ativados pelo GSNO.

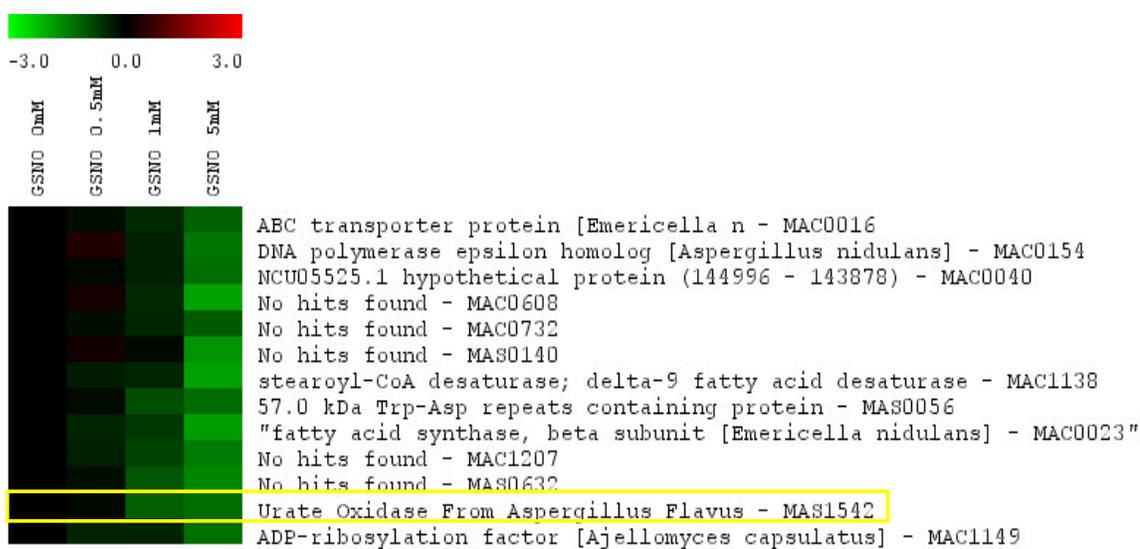


Figura 18: Cluster 23. Destacado em amarelo a enzima urato oxidase, que cataboliza o ácido úrico.

No cluster 23 (**figura 18**) observa-se que a sub-regulação dos genes ocorreu de maneira dose dependente. A enzima urato oxidase cataboliza o ácido úrico, com a sub-regulação desta enzima possibilita-se um aumento da concentração do substrato.

O ácido úrico tem sido reconhecido como um antioxidante por ser um poderoso sequestrador de radicais livres, sua proteção parece ser devido sua oxidação preferencial. A formação de ácido úrico é um mecanismo de defesa antioxidante contra a nitração derivada do peroxinitrito porém sua função parece ser para radicais gerados pela decomposição do ONOO^- como o NO_2 . O fato do ONOO^- reagir 920 vezes mais rápido com o CO_2 do que com o ácido úrico, indica que ele não seja um sequestrador direto do ONOO^- e sim de seus derivados. Além disto, ele pode quelar íons metálicos, por ligar-se aos íons ferro e cobre em formas aparentemente pouco reativas. (SCOTT *et al.*, 2002; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000; SQUADRITO *et al.*, 2000; SKINNER *et al.*, 1998). A sub-regulação da enzima urato oxidase em *P. brasiliensis*, mostrada na **figura 18**, está de acordo com estes dados, sugerindo que o fungo possa usar o ácido úrico para proteção contra o estresse nitrosativo.

A seguir estão mostrados os “clusters” que apresentaram um padrão de super expressão após exposição ao GSNO.

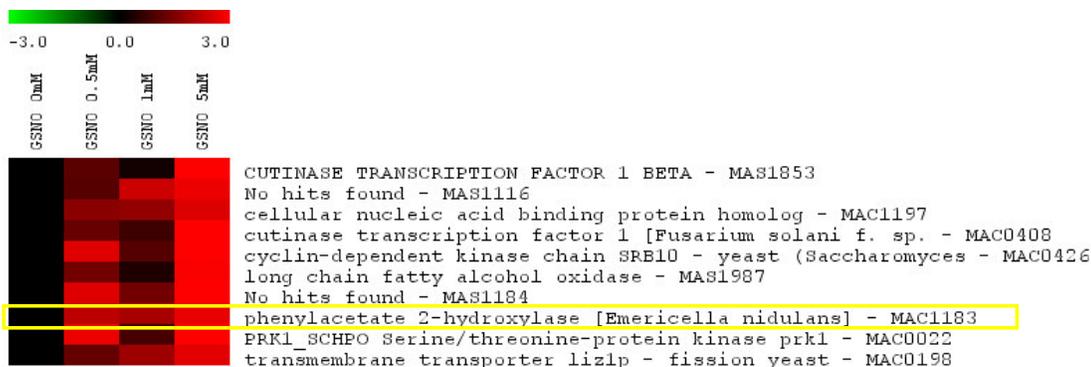


Figura 19: Cluster 47. Destacado em amarelo observa-se o gene da fenilacetato 2-hidroxilase.

No “cluster” 47 (**figura 19**) observa-se que a expressão dos genes foi bastante aumentada após a exposição a GSNO 5mM. Neste “cluster” destaca-se a enzima fenilacetato 2-hidroxilase que converte fenilacetato a homogentisato em reação que requer duas etapas (MINGOT, PEÑALVA e FERNÁNDEZ-CAÑON, 1999). O ácido homogentísico pode agir como um sequestrador de espécies reativas de oxigênio ou de compostos derivados do NO (NUNES *et al.*, 2005). A super expressão da fenilacetato 2-hidroxilase é compatível com esta informação. Uma vez que o NO parece ser decisivo para o sucesso da resposta imune do hospedeiro contra a infecção por *P. brasiliensis*, o acúmulo de moléculas sequestradoras pode ser uma resposta importante para a defesa do fungo.

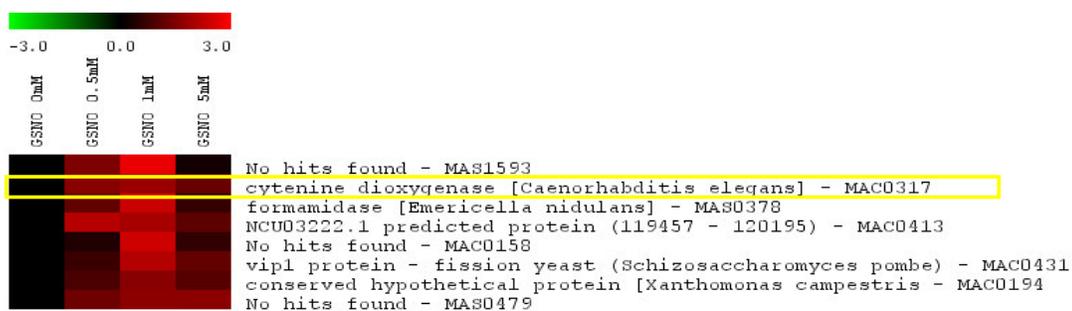


Figura 20: Cluster 01. Destacado em amarelo a enzima cisteína dioxigenase, que converte cisteína a taurina.

Os genes agrupados no “cluster” 01 (**figura 20**) possuem um padrão de super expressão em resposta as três concentrações de GSNO utilizadas, sendo que a maioria destes genes apresentou maior resposta na concentração de 1mM. Em destaque nesta figura está a enzima cisteína dioxigenase que catalisa a conversão de cisteína a cisteína sulfinato, cuja descarboxilação pela cisteína-sulfinato descarboxilase gera o aminoácido taurina (PENTTILA, 1990; TAPPAZ, 2004).

A taurina é um aminoácido que apresenta várias funções citoprotetoras contribuindo para a proteção da célula contra diferentes tipos de danos em diversos modelos biológicos os quais possuem em comum, como característica patogênica, a inflamação. As funções da taurina não estão totalmente compreendidas, mas parecem envolver a adaptação ao desequilíbrio osmótico, modulação intracelular de cálcio, estabilização de membranas e proteínas e efeitos antioxidantes (DOMINY *et al.*, 2006; TAPPAZ, 2004; BARUA, LIU e QUINN, 2001).

A administração profilática de taurina protege o pulmão de danos induzidos pela inalação de NO₂ ou O₃ e pela instilação intratraqueal de paraquat, todos estes modelos de danos pulmonares envolvem um influxo de neutrófilos e macrófagos seguidos da produção de mediadores da inflamação (BARUA, LIU e QUINN, 2001).

Com relação aos danos causados pelo NO, Liu e colaboradores (1992) propõem que a taurina deve funcionar como um seqüestrador de NO no cérebro, agindo como um inibidor do neurotransmissor. O NO possui uma meia vida de 6 segundos, o que representa um problema na sua função como neurotransmissor, porque neste tempo ele pode difundir-se a distâncias relativamente longas. Esta propriedade aliada a falta de um sistema de recaptura e ao potencial citotóxico desta molécula fazem com que haja necessidade de um controle e neutralização do NO nas células localizadas próximas aos locais de produção. Foi mostrado que as concentrações de taurina são altas em tecidos que produzem radicais oxidantes e que

ela também protege contra danos causados por radiação, e, com base nestes dados Liu e colaboradores (1992) sugeriram que a taurina possa ser a substância que neutraliza os efeitos do NO no cérebro.

Embora o mecanismo de proteção da taurina não esteja totalmente esclarecido, estudos mais recentes, a maioria deles realizado em mamíferos, sugerem que a formação de taurina cloramina (Tau-Cl) responde pelo efeito protetor da taurina (LIU *et al.*, 1998).

Após a fagocitose, neutrófilos e monócitos, através da enzima mieloperoxidase, geram ácido hipocloroso (HOCl). A taurina reage com o HOCl e forma a taurina cloramina. Vários estudos indicam que a taurina cloramina inibe a produção de NO, TNF- α e outros mediadores da inflamação (GAUT *et al.*, 2002; NAGL *et al.*, 2000; BARUA, LIU e QUINN, 2001; HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2000). Dentre estes estudos pode-se citar o realizado por Marcinkiewicz e colaboradores (1999) em que foi relatado que a produção de NO, por células dendríticas murinas contra organismos patogênicos, foi inibida por taurina cloramina de maneira dose dependente. Estudos realizados com macrófagos alveolares de ratos verificaram que a inibição de NO e TNF- α pela Tau-Cl foi por diminuição da expressão dos genes de iNOS e TNF- α por atenuação da via NF- κ B (BARUA, LIU e QUINN, 2001).

Como citado anteriormente, dados clínicos e experimentais indicam que a resposta imune celular, composta principalmente por macrófago, mas também por neutrófilos, é o principal mecanismo de defesa contra a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* (ANDRADE *et al.*, 2005; MISSALL, LODGE e McEWEN, 2004; GONZALEZ *et al.*, 2000; BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002). Uma vez que os neutrófilos estão relacionados com a produção de HOCl, e que como mostrado no “cluster” 1, o fungo *P. brasiliensis* responde ao estresse nitrosativo com super expressão do gene de cisteína dioxigenase poderia haver a produção de taurina cloramina no local da infecção.

Por outro lado alguns estudos indicam que a taurina cloramina apresenta efeito bactericida contra *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *P. mirabilis* ATCC 14153, *E. coli* ATCC 11129 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 (NAGL *et al.*, 2000) e fungicida contra *Candida sp* (NAGL *et al.*, 2002). Deve ser destacado que Barua, Liu e Quinn (2001), utilizando NR8383, uma linhagem de células derivadas de macrófagos alveolares de ratos, observaram um aumento na produção de Hsp 70 por Tau-Cl. O aumento de Hsp 70 pode ser um mecanismo de inibição da produção de NO, como será discutido a seguir.

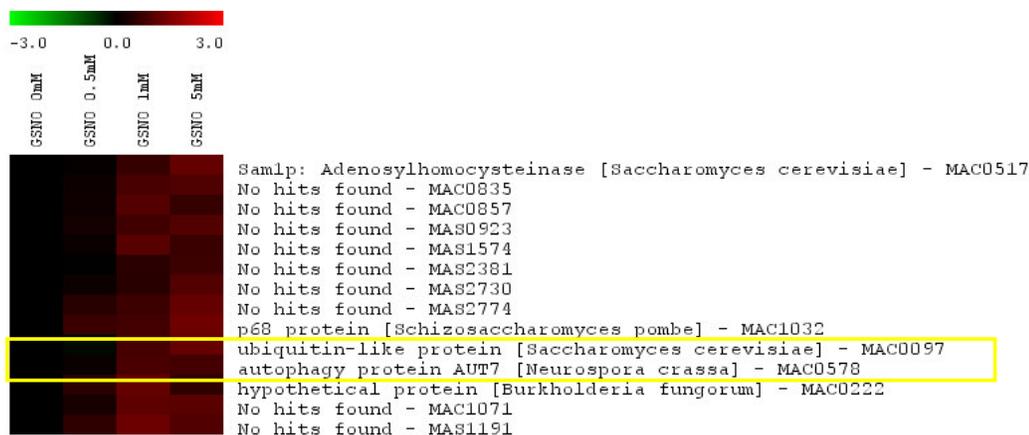


Figura 21: Cluster 41. Em destaque um gene que codifica para ubiquitina e um para a proteína de autofagia AUT 7.

Na **figura 21** pode ser observado o “cluster” 41 que apresenta genes com moderada super expressão em resposta a exposição ao GSNO.

No “cluster” 41 destaca-se a presença de uma proteína relacionada a ubiquitina. A ubiquitina liga-se a outras proteínas, em um processo denominado ubiquitinação, que em muitos casos leva a degradação protéica pelo proteassoma, esta via está relacionada a degradação de proteínas indesejáveis à célula, incluindo as com função anormal. A indução de ubiquitina também foi observada em *H. capsulatum* em resposta a ERN (NITTLER *et al.*, 2005). Em *M. tuberculosis*, também é sugerido que a degradação protéica é necessária para a resposta deste microrganismo ao estresse nitrosativo, pois estudos indicaram alteração nesta via proteolítica em mutantes incapazes de crescer após exposição a ERN, além disto, o tratamento com inibidores destas proteínas resultaram em aumento da suscetibilidade a ERN (NITTLER *et al.*, 2005).

Observa-se também a presença da proteína de autofagia AUT7. A autofagia pode ser desencadeada por escassez de nutrientes, por um processo em que os componentes citoplasmáticos são seqüestrados pelo autofagossomo e enviados para a degradação pelos lisossomos, e os produtos resultantes são reciclados para outras vias metabólicas. Apesar de ter sido caracterizado como um processo aleatório, um crescente número de evidências tem sugerido que a autofagia da mitocôndria, chamada de mitofagia, e possivelmente também de outras organelas são seletivas. A evidência desta seletividade é proveniente de um trabalho recente utilizando leveduras, que identificou uma proteína específica na membrana externa da mitocôndria, a Uth1p, cuja presença é necessária para mitofagia, mas não para a autofagia de proteínas citosólicas (KISSOVÁ *et al.*, 2006). Estudos têm sugerido que a mitofagia é a principal rota pela qual a mitocôndria é degradada, e parece ser induzida pela célula para

eliminar mitocôndrias com funcionamento anormal, desta forma a célula eliminaria danos causados por ERO e produtos desnecessários oriundos do metabolismo, este processo parece também ser fundamental no retardo do acúmulo de mutações do mtDNA, uma vez que permite a renovação mitocondrial (ABELIOVICH, 2007; KIM, RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, LEMASTERS, 2007; MIJALJICA, PRESCOTT, DEVENISH, 2007; LEMASTERS, 2005). Os resultados obtidos por Priault e colaboradores (2005) indicam a mitofagia como uma resposta a uma sinalização intracelular de disfunção energética, corroborando para a idéia de que ela pode ser induzida por estresse em um mecanismo que visa a manutenção da homeostasia celular. Neste estudo foi correlacionado a mitofagia com morte celular, e proposto que a autofagia poderia mudar de um programa de sobrevivência que preveniria a proliferação de mitocôndria anormais para um mecanismo de morte celular, iniciado em células que não poderiam se recuperar dos danos mitocondriais. Outro dado interessante a cerca da mitofagia que deve ser destacado é o relato que durante a maturação este processo foi dependente da ubiquitina (MIJALJICA, PRESCOTT, DEVENISH, 2007).

A expressão de genes de autofagia já havia sido verificada em outros organismos após exposição a ERN. Em *C. neoformans* dois genes pertencentes a esta família, ATG3 e ATG9, foram super expressos após a fagocitose deste fungo por macrófagos murinos (FAN et al., 2005). Os resultados apresentados na **figura 21** sugerem que a mitofagia possa ser induzida por *P. brasiliensis* em resposta ao estresse nitrosativo.

O processo de “clusterização” pode também ser feito manualmente, através da junção dos dados de expressão para os genes de interesse em um único arquivo. Este arquivo, quando lido no MEV, mostra um “cluster” com os padrões de resposta dos genes escolhidos, conforme mostrado na **figura 30**. Nesta, foram agrupados os genes de proteína “heat-shock”, presentes no “chip” e que apresentaram uma variação na expressão estatisticamente significativa. A Hsp16 e a Hsp 30 foram agrupadas nos clusters 45 e 54 respectivamente através da clusterização hierárquica com o auxílio do algoritmo “K-means” (**Figura 13**).

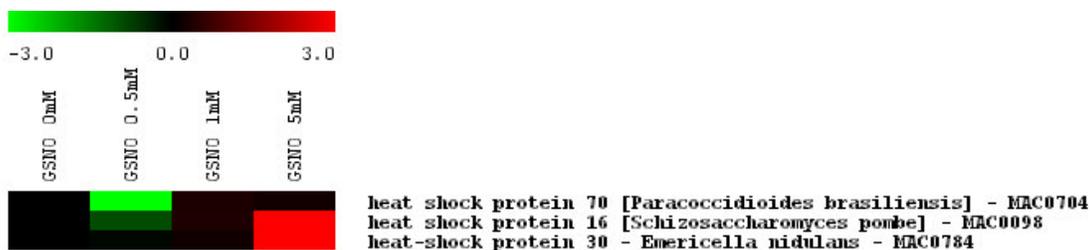


Figura 22: “Clusterização” manual dos genes de Hsp16, 30 e 70. Observa-se que o gene da proteína “heat-shock” 16, apresentou-se sub regulado na presença de GSNO 0,5mM e super expresso nas outras duas concentrações. O gene que codifica para a proteína “heat-shock” 30 mostrou expressão bastante aumentada, principalmente para exposição a GSNO 5mM, já o gene da proteína “heat-shock” 70 mostrou ser sub-regulado frente a GSNO 0,5mM e levemente super expresso nas concentrações de 1mM e 5mM.

Na **figura 22**, observa-se o gene que codifica a proteína de “heat-shock” 70 (Hsp 70). Membros da família Hsp 70 funcionam como “chaperonas”, pois estabilizam cadeias polipeptídicas durante a tradução e o transporte destas moléculas (COOPER, 2002), porém, estudos recentes têm mostrado uma função mais ampla para a Hsp 70 (LAI *et al.*, 2005). Estudos realizados por Mun e colaboradores (2000) correlacionaram a super expressão de Hsp 70 por *Toxoplasma gondii* com a mortalidade de camundongos infectados com este protozoário. Os resultados deste estudo mostraram que após a injeção de Hsp 70, de *T. gondii*, houve diminuição da liberação de NO pelos macrófagos murinos. A adição de γ -IFN para estimular a liberação de NO também não resultou em aumento desta molécula na presença de Hsp 70 (MUN *et al.*, 2000). Os autores concluíram que a Hsp 70 inibe a liberação de NO por macrófagos murinos infectados com *T. gondii*, porém o mecanismo pelo qual tal inibição ocorre não foi avaliado (MUN *et al.*, 2000).

Também foi relatado por Lai e colaboradores (2005) que a super expressão de Hsp 70 confere neuroproteção ao estresse nitrosativo. Neste trabalho foi utilizada a proteína Hsp 70 acoplada com a seqüência sinalizadora do TAT, um trans-ativador de transcrição do vírus da imunodeficiência humana (HIV), que facilita a internalização do peptídeo. O aumento desta Hsp 70 nos neurônios, após a exposição ao peroxinitrito, preservou as funções mitocondriais destas células e também reduziu a liberação de lactato desidrogenase, um evento que comumente antecede a morte celular. A mitocôndria é uma das organelas mais afetadas por ERN e os resultados deste estudo sugerem que a proteção fornecida pela Hsp 70 aos neurônios se dá pela preservação das funções desta organela, porém o mecanismo pelo qual isto ocorre ainda não foi esclarecido (LAI *et al.*, 2005).

Em fungos já havia sido observada a super expressão de Hsp 70 por estresse nitrosativo em *H. capsulatum* (NITTLER *et al.*, 2005). Em *P. brasiliensis* a Hsp 70 foi

levemente super expressa após exposição a GSNO na concentração de 1mM e 5mM, apesar de apresentar pequena modulação, esta proteína pode desempenhar um papel importante na proteção do fungo a ERN, como já foi observado para outros organismos.

Com relação as proteínas da família “heat-shock” outros dois genes, Hsp 30 e a Hsp 16, apresentaram expressão diferencial (**Figura 22**). Em *Xenopus laevis* foi demonstrado o aumento da produção de Hsp 30 em resposta ao estresse oxidativo (MULLER, GAULEY e HEIKKILA, 2004). Estudos realizados em nosso laboratório demonstram que em *P. brasiliensis* a Hsp 30 e a Hsp 16 foram super expressas em resposta ao peróxido de hidrogênio (dados não publicados). Os dados apresentados na **figura 22** mostraram um perfil similar destas proteínas em resposta ao estresse nitrosativo quando comparado ao oxidativo. A Hsp 16 também foi induzida em resposta ao estresse oxidativo em *Schizosaccharomyces pombe* (YASUKO *et al.*, 2006), em *Caenorhabditis elegans* (STRAYER, 2003) e em *Mycobacterium tuberculosis* (ABULIMITI *et al.*, 2003). Não há até o momento nenhum relato na literatura de indução de Hsp 16 ao estresse nitrosativo. Sugere-se desta forma, que em *P. brasiliensis* a Hsp16 e a Hsp 30 podem fornecer proteção a este fungo em resposta ao estresse nitrosativo, função que ainda havia não sido proposta para estas proteínas.

4.3 CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS DE MICROARRANJO ATRAVÉS DE RT-PCR EM TEMPO REAL

Para confirmação dos dados de microarranjo utilizou-se a técnica de RT-PCR em tempo real que é baseada na cinética de amplificação que detecta o acúmulo do produto de PCR a partir de um RNA alvo ao longo de reações de amplificação (HEID *et al.*, 1996). Ela tem sido amplamente usada para análise de expressão de genes isolados e para confirmar dados obtidos em experimentos de hibridação em microarranjo de DNA (DONNINGER *et al.*, 2004; BONAVENTURE *et al.*, 2002; RAJEEVAN *et al.*, 2001).

A partir dos resultados obtidos nos experimentos de microarranjo de DNA, 10 genes que apresentaram modulação estatisticamente significativa ao estresse nitrosativo foram submetidos à quantificação por RT-PCR em tempo real para a verificar o grau de concordância entre os resultados obtidos por duas metodologias independentes (**figura 23**). A análise de comparação qualitativa destes resultados, em que foi verificado o número de casos em que o \log_2 da razão da expressão dos genes indicou a ocorrência de sub-regulação ou super expressão nas duas metodologias, mostrou que aproximadamente 64% dos pontos avaliados apresentaram modulação qualitativamente semelhante, um nível de concordância condizente com os valores observados na literatura que mostraram resultados próximos de 70% (SU *et al.*, 2007; DALLAS *et al.*, 2005). Estes resultados são de extrema importância, pois a obtenção de elevados níveis de concordância entre duas metodologias completamente independentes mostra que a metodologia de processamento dos dados de microarranjo é capaz de fornecer uma visão global do transcriptoma da célula com alto grau de confiabilidade.

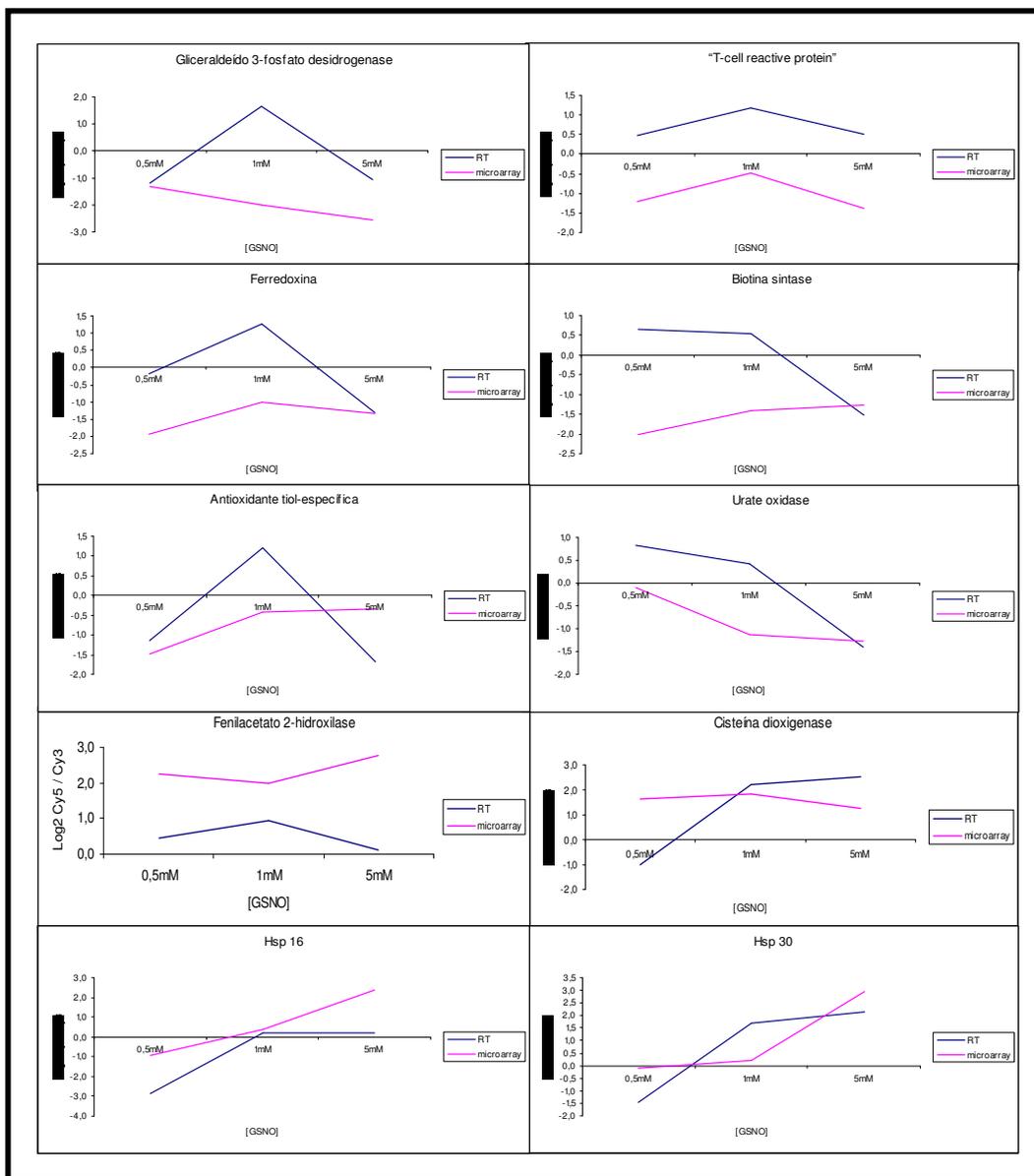


Figura 23: Padrão de variação de expressão de 10 genes através da hibridação em microarranjo comparado com o resultado obtido na análise por RT-PCR em tempo real. A linha rosa mostra os resultados obtidos pela técnica de microarranjo de DNA, enquanto a linha azul mostra os de RT-PCR em tempo real. Em ambos os casos, a modulação gênica é expressa pelo logaritmo na base 2 da razão entre as intensidades dos dois canais [$\text{Log}_2 (\text{Cy}5/\text{Cy}3)$].

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

A análise diária do crescimento de *P. brasiliensis* após adição de concentrações crescentes de GSNO possibilitou determinar a resistência deste fungo ao doador de NO.

Os resultados anteriormente apresentados para os experimentos de microarranjo de DNA mostram a caracterização de uma série de genes envolvidos na resposta de *P. brasiliensis* ao estresse nitrosativo, simulando a situação causada pelos macrófagos durante a infecção por este patógeno. Dentre estes genes houve uma grande modulação de seqüestradores de NO e ERN, como a fenilacetato 2-hidroxilase, cisteína dioxigenase e urato oxidase, além da identificação das Hsp 16 e 30. O papel desempenhado por estas Hsps durante o estresse nitrosativo ainda não foi estabelecido, uma vez que até o momento não houve publicação sobre este assunto, mas os dados obtidos neste trabalho sugerem que elas possam estar envolvidas na proteção a este tipo de estresse, representando uma nova função para estas proteínas.

Os resultados obtidos na avaliação da resposta ao estresse nitrosativo em *P. brasiliensis* indicaram a indução de um maior número de seqüestradores de NO e ERN do que para mecanismos de detoxificação destas espécies. Muitas enzimas responsáveis pela resistência ao estresse nitrosativo têm sido identificadas através de estudos gênicos em microrganismos. Estas enzimas indicam os candidatos iniciais para examinar as vias envolvidas na resistência ao estresse nitrosativo de fungos patogênicos (MISSALL, LODGE e McEWEN, 2004). Em bactérias a detoxificação direta de NO é realizado pela flavohemoglobina denitrosilase. Enzimas que metabolizam produtos com grupamentos S-NO também protegem as células do estresse nitrosativo, nesta classe está a GSNO redutase, que reduz GSNO a amônia e glutathiona dissulfito. Além destas, enzimas que reparam danos ao DNA ou proteínas, causados por ERN, também devem conferir resistência ao estresse nitrosativo (DE JESÚS-BERRÍOS *et al.*, 2003). Em fungos a ação da flavohemoglobina denitrosilase foi relatada em algumas espécies como *S. cerevisiae* (HORAN, BOURGES e MEUNIER, 2006) e *C. albicans* (ULLMANN *et al.*, 2004). A flavohemoglobina denitrosilase e a GSNO redutase também estão relacionadas com a virulência de *C. neoformans* (DE JESÚS-BERRÍOS *et al.*, 2003). Estas duas enzimas são os principais candidatos para o estudo da resistência de outros fungos ao estresse nitrosativo, no presente trabalho não foi possível identificá-las em *P. brasiliensis*, pois ambas não estão presentes em nosso chip.

Análises futuras para confirmar e elucidar o papel das Hsps 16 e 30, bem como estudos referentes ao gene cisteína dioxigenase contribuiriam para um melhor entendimento dos mecanismos relacionados a proteção ao estresse nitrosativo em *P.brasiliensis* e provavelmente também em outros organismos.

REFERÊNCIAS

ABELIOVICH, H. Mitophagy: the life-or-death dichotomy includes yeast. **Autophagy.**, v. 3, n. 3, p. 275-277, 2007.

ABULIMITI, A.; QIU, X.; CHEN, J.; LIU, Y.; CHANG, Z. Resversible methionine sulfoxidation of *Mycobacterium tuberculosis* small heat shock protein Hsp 16.3 and its possible role in scavenging oxidants. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 305, n. 1, p. 87-93, 2003.

ALMEIDA, A. J.; MTUTE, D.R.; CARMONA, J.A.; MARTINS, M.; TORRES, I.; McEWEN, J.G.; RESTREPO, A.; LEÃO, C.; LUDOVICO, P.; RODRIGUES, F. Genome size and ploidy of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals a haploid DNA content: flow cytometry and GP43 sequence analysis. **Fungal Genet Biol.**, v. 44, n. 1, p. 25-31, 2007.

ANDRADE, R. V.; DA SILVA, S. P.; TORRES, F. A.G.; FONSECA, M. J. P.; PEREIRA, I. S.; MARANHÃO, A. Q.; CAMPOS, E. G., MORAES, L. M. P.; JESUÍNO, R. S. A.; PEREIRA, M.; SOARES, C. M. A.; WALTER, M. E. M. T.; CARVALHO, M. J. A.; ALMEIDA, N. F.; BRÍGIDO, M. M.; FELIPE, M. S. S. Overview and perspectives on the transcriptome of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 22, n. 4, p. 203-212, 2005.

ANJUM, M. F.; STEVANIN, T. M.; READ, R. C.; MOIR, J. W. B. Nitric Oxide Metabolism in *Neisseria meningitidis*. **J. Bacteriol**, v. 184, n. 11, p. 2987-2993, 2002.

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.

BAGAGLI, E.; BOSCO, S. G.; THEODORO, R. C.; FRANCO, M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect Genet Evol**, v.6, n.5, p. 344-351, 2006.

BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K. I. R.; ALQUATI, S.; MIYAJI, M.; DE CAMARGO, Z. P.; GOMES, G. M.; FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 58, n. 4, p. 505-512, 1998.

BARUA, M.; LIU, Y.; QUINN, M. R. Taurine Chloramine Inhibits inducible Nitric Oxide Synthase and TNF- α Gene Expression in Activation and I κ B Kinase Activity. **J. Immunol**, v. 167, n. 4, p. 2275-2281, 2001.

BASTOS, K. P.; BAILÃO, A. M.; BORGES, C. L.; FARIA, F. P.; FELIPE, M. S. S.; SILVA, M. G.; MARTINS, W. S.; FIÚZA, R. B.; PEREIRA, M., SOARES, C. M. A. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. **BMC Microbiol**, v. 7, n. 29, 2007.

BLASI, E.; PITZURRA, L.; PULITI, M.; CHIMIANTI, A.R.; MAZZOLLA, R.; BARLUZZI, R.; BISTONI, F. Differential susceptibility of yeast and hyphal forms of *Candida albicans* to macrophage-derived nitrogen-containing compounds. **Infect. Immun.**, v.63, n.5, p. 1806-1809, 1995.

BOCCA, A.; HAYASHI, E. E.; PINHEIRO, A. G.; FURLANETTO, A. B.; CAMPANELLI, A. P.; CUNHA, F. Q.; FIGUEIREDO, F. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **J. Immunol**, v. 161, n. 6, p. 3056-3063, 1998.

BONAVENTURE, P.; GUO, H.; TIAN, B.; LIU, X.; BITTNER, A.; ROLAND, B.; SALUNGA, R.; MA, X. J.; KAMME, F.; MEURERS, B.; BAKKER, M.; JURZAK, M.; LEYSEN, J. E.; ERLANDER, M. G. Nuclei and subnuclei gene expression profiling in mammalian brain. **Brain Res**. v. 943, n. 1, p. 38-47, 2002.

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.

BORGES-WALMSLEY, M. I.; WALMSLEY, A. R. cAMP signaling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity. **Trends Microbiol.**, v.8, n.3, p. 133-141, 2000.

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

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. **Infect. Immun.**, v.57, n.8, p. 2289-2294, 1989.

BRÜNE, B.; CANTONI, O. Nitric oxide-mediated redox reactions in pathology, biochemistry and medicine. **Cell Death Diff.**, v. 7, n. 10, p. 1018 -1020, 2000.

BRÜNE, B.; von KNETHEN, A.; SANDAU, K. B. Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. **Cell Death Diff.**, v. 6, n. 10, p. 969-975, 1999.

BRYAN, N. S.; RASSAF, T.; MALONEY, R. E.; RODRIGUEZ, C. M.; SAIJO, F.; RODRIGUEZ, J. R. Cellular targets and mechanisms of nitro(ylation): An insight into their nature and kinetics in vivo. **PNAS**, v. 101, n. 12, p. 4308-4313, 2004.

BURWELL, L. S.; NADTOCHIY, S. M.; TOMPIKINS, A. J.; YUNG, S.; BROOKES, P. S. Direct evidence for S-Nitrosation of mitochondrial complex I. **Biochem. J.**, v. 394, pt. 3, p. 627-634, 2006.

CALCAGNO, A. M.; NINO-VEGA, G.; SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G. Geographic discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* strains by Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis. **Clin Microbiol**, v. 36, n. 6, p. 1733-1736, 1998.

CAMPOS, E. G.; JESUINO, R. S. A.; DANTAS, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; FELIPE, M. S. Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Genet Mol Res.**, v. 4, n. 2, p. 409-429, 2005.

CANO, M. I. N.; CISALPINO, P. S.; GALINDO, I.; RAMIREZ, J. L.; MORTARA, R. A.; DA SILVEIRA, J. F. Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 3, p. 742-747, 1998a.

CANO, L. E.; KASHINO, S. E.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D.; XIDIEH, C. F.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ C. A. C.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 66, n.2, p. 800-806, 1998b.

CASOTTO, M. Characterization of the cellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form. **Clin Microbiol**, v. 28, n. 6, p. 1188-1193, 1990.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido Nítrico. Revisão. **Acta Cir Bras**, v. 17, n.6, p. 417-423, 2002.

CHEUNG, V. G.; MORLEY, M.; AGUILAR, Francisco; MASSIMI, Aldo; KUCHERLAPATI, Raju; CHILDS, Geoffrey. Making and reading microarrays. **Nat Genet.**, v. 21, suplemento 1, p. 15-19, 1999.

CLARK, I. A.; MACMICKING, J. D. GRAY, K. M.; ROCKETT, K. A.; COWDEN, W.B. Malaria mimicry with tumor necrosis factor. Contrasts between species of murine malaria and *Plasmodium falciparum*. **Am J. Patol**, v. 140, n. 2, p. 325-336, 1992.

COOPER, G. M. **The Cell – a Molecular Approach**. 2. ed. Washington: ASM Press, 2002. p. 292-293.

DALLAS, P. B.; GOTTARDO, N. G.; FIRTH, M. J.; BEESLEY, A. H.; HOFFMANN, K.; TERRY, P. A.; FREITAS, J. R.; BOAG, J. M.; CUMMINGS, A. J.; KEES, U. R. Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR- how well do they correlate?. **BMC Genomics**, v.6, n.59, 2005.

DÍAZ, I. A. C. On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*. Our hypothesis of 1989: Present status and perspectives. **Rev Inst. Trop S. Paulo**. v. 49, n. 2, p. 131-134, 2007.

DOMINY, J. E., Jr; SIMMONS, C. R.; KARPLUS, P. A.; GEHRING, A. M.; STIPANUK, M. H. Identification and characterization of bacterial cysteine dioxygenases: a new route of cysteine degradation for Eubacteria. **J. Bacteriol**, v. 188, n. 15, p. 5561-5569, 2006.

DONNINGER, H.; BONOME, T.; RADONOVICH, M.; PISE-MASISON, C. A.; BRADY, J.; SHIH, J. H.; BARRETT, J. C.; BIRRER, M. J. Whole genome expression profiling of advance stage papillary serous ovarian cancer reveals activated pathways. **Oncogene**. v. 23, n. 49, p. 8065-8077, 2004.

DUDOIT, S.; YANG, Y.H.; CALLOW, M.J.; SPEED, T.P. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. **Statist Sinica**, v. 12, p.111-139, 2002.

DUGGAN, D. J.; BITTNER, M.; CHEN, Y.; MELTZER, P.; TRENT, J. M. Expression profiling using cDNA microarrays. **Nat Genet**, v. 21, suplemento 1, p. 10-14, 1999.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

FAN, W.; KRAUS, P. R.; BOILY, M. J.; HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* gene expression during murine macrophage infection. **Eukaryot. Cell**, v. 4, n. 8, p. 1420-1433, 2005.

FIROVED, A. M.; WOOD, S. R.; ORNATOWSKI, W.; VOJO, D.; TIMMINS, G. S. Microarray analysis and functional characterization of the nitrosative stress response in nonmucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.** v. 186, n.12, p. 4046, 2004.

GAUT, J. P.; BYUN, J.; TRAN, H. D.; LAUBER, W. M.; CARROLL, J. A.; HOTCHKISS, R. S.; BELAAOUAJ, A.; HEINECKE, J. W. Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo. **J. Clin. Invest.** v. 109, n. 10, p. 1311-1319, 2002.

GODOY, L.; GONZÁLEZ-DUARTE, R.; ALBALAT, R. S-nitrosogluthathione reductase activity of amphioxus ADH3: Insight into the nitric oxide metabolism. **Int. J. Biol. Sci.**, v.2, n. 3, p. 117-124, 2006.

GONZALEZ, A.; DE GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* Conidia. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 5, p. 2546-2552, 2000.

GONZALEZ, A.; SAHAZA J. H., ORTIZ, B. L.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Med. Mycol.**, v. 41, n. 5, p. 391-399, 2003.

GONZALEZ, A.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Role of iron in the nitric oxide-mediated fungicidal mechanism of IFN- γ -activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 49, n. 1, p. 11-16, 2007.

GUKASYAN, H. J.; KANNAN, R.; LEE, V. H. I.; KIM, K. J. Regulation of L-cystine transport and intracellular GSH level by a nitric oxide donor in primary cultured rabbit conjunctival epithelial cell layers. **IVOS**, v. 44, n. 3, p. 1202-1210, 2003.

HAHN, R. C.; MACEDO, A. M.; FONTES, C. J. F.; BATISTA, R. D.; SANTOS, N. L.; HAMDAN, J. S. Randomly Amplified Polymorphic DNA as a valuable tool for epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clin Microbiol**, v. 41, n. 7, p. 2849-2854, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3. ed. Londres: Oxford Science Publications, 2000, 935p.

HARE, J. M.; STAMLER, J. S. NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 3, p. 509-517, 2005.

HECTOR, R. F. Compounds active against cell walls of medically important fungi. **Clin Microbiol Rev**, v. 6, n. 1, p. 1-21, 1993.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Res.** v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

HOFMANN, B. DNA Microarrays. **Nephron. Physiol.**, v. 99, n. 3, p. 85-9, 2005.

HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 9, n. 4, p. 469-488, 1996.

HORAN, S.; BOURGES, I.; MEUNIER, B. Transcriptional response to nitrosative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, n. 7, p. 519-535, 2006.

HORNBY, J. M.; JACOBITZ-KIZZIER, S. M.; McNEEL, D. J.; JENSEN, E. C.; TREVES, D. S.; NICKERSON, K. W. Inoculum size effect in dimorphic fungi: extracellular control of yeast-mycelium dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. **Appl Environ Microbiol.**, v. 70, n. 3, p. 1356-1359, 2004.

HROMATKA, B. S.; NOBLE, S. M.; JOHNSON, A. D. Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the *YHB1* gene in nitrosative stress and virulence. **Mol. Biol. Cell.**, v. 16, n.10, p. 4814-4826, 2005.

JAMES, S. L.; GLAVEN, J. Macrophage cytotoxicity against schistosoma of *Shistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. **J. Immunol**, v. 143, n. 12, p. 4208-4212, 1989.

de JESÚS-BERRÍOS, M.; LIU, L.; NUSSBAUM, J. C.; COX, G. M.; STAMLER, J. S.; HEITMAN, J. Enzymes that counteract nitrosative stress promote fungal virulence. **Curr. Biol.**, v.13, n.22, p. 1963-1968, 2003.

JOURD'HEUIL, D.; JOURD'HEUIL, F. L.; FEELISH, M. Oxidation and nitrosation of thiols at low micromolar exposure to nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 18, p. 15720- 15726, 2003.

KAMIYA, H. Mutagenic potentials of damaged nucleic acids produced by reactive oxygen/nitrogen species: approaches using synthetic oligonucleotides and nucleotides. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 2, p. 517-531, 2003.

KIM, I.; RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S.; LEMASTERS, J. J. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. **Arch Biochem Biophys.**, v. 462, n. 2, p. 245-253, 2007.

KISSOVA, I.; PLAMONDON, L. T.; BRISSON, L.; PRIAULT, M.; RENOUF, V.; SCHAEFFER, J.; CAMOUGRAND, N.; MANON, S. Evaluation of the roles of apoptosis, autophagy, and mitophagy in the loss of plating efficiency induced by Bax expression in yeast. **J Biol Chem.**, v. 281, n. 47, p. 36187-36197, 2006.

KUROKAWA, C. S.; ARAUJO JR, J. P.; SOARES, A. M. V. C.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. S. Pro- and Anti- inflammatory cytokines produced by human monocytes challenged in vitro with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbiol. Immunol.**, v. 51, n. 4, p. 421-428, 2007.

LAI, Y.; DU, L.; DUNSMORE, K. E.; JENKINS, L. W.; WONG, H. R.; CLARK, R. S. B. Selectively increasing inducible heat shock protein 70 via TAT-protein transduction proteins neurons from nitrosative stress and excitotoxicity. **J. Neurochem**, v. 94, n. 2, p. 360-366, 2005.

LANGE, H.; KAUT, A.; KISPAL, G.; LILL, R. A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron- sulfur proteins. **PNAS**, v. 97, n. 3, p. 1050-1055, 2000.

LEMASTERS, J. J. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. **Rejuvenation Res.**, v. 8, n. 1, p. 3-5, 2005.

LIU, L.; ZENG, M.; HAUSLADEN, A.; HEITAN, J.; STAMLER, J. S. Protection from nitrosative stress by yeast flavohemoglobin. **PNAS**, v. 97, n. 9, p. 4672-7676, 2000.

LIU, L.; HAUSLADEN, A.; ZENG, M.; QUE, L.; HELTMAN, J.; STAMLER, J. S. A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. **Nature**, v. 410, n. 6827, p. 490-494, 2001.

LIU, Q. R.; LÓPEZ-CORCUERA, B.; NELSON, H.; MANDIYAN, S.; NELSON, N. Cloning and expression of cDNA encoding the transporter of taurine and β -alanine in mouse brain. **PNAS**, v. 89, n. 24, p. 12145-12149, 1992.

LIU, Y.; TONNA-DEMASI, M.; PARK, E.; SCHULLER-LEVIS, G.; QUINN, M. R. Taurine chloramines inhibits production of nitric oxide and prostaglandin E2 in activated C6 glioma cells by suppressing inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression. **Brain Res. Mol. Brain Res.** v. 59, n. 2, p. 198-195, 1998.

LORENZ, M. C.; BENDER, J. A.; FINK, G. R. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. **Eucaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1076-1087, 2004.

MARCINKIEWICZ, J.; NOWAK, B.; GABOWSKA, A.; BOMEK, M.; PETROVSKA, L.; CHAIN, B. Regulation of murine dendritic cell functions in vitro by taurine chloramine, a major product of the neutrophil myeloperoxidase-halide system. **Immunology**, v. 98, n. 3, p. 371-378, 1999.

MARESCA, B.; KOBAYASHI, G. S. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi. **Microbiol Rev.**, v. 53, n. 2, p. 186-209, 1989.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose: Atualização epidemiológica, clínica, e terapêutica. **An. Bras. Dermatol**, v. 78, n. 2, p. 135-150, 2003.

MASON, M. G.; NICHOLLS, P.; WILSON, M. T.; COOPER, C. E. Nitric oxide inhibition of respiration involves both competitive (heme) and noncompetitive (copper) binding to cytochrome *c* oxidase. **PNAS**, v. 103, n. 3, p. 708-713, 2006.

MATTNER, J.; STEINHAUSER, A. W.; PAHK, A.; ROLLINGHOFF, M.; MAJEAU, G. R.; HOCHMAN, P. S.; BOGDAN, C. Protection against progressive leishmaniasis by IFN- γ . **J Immunol.**, v. 172, n.12, p. 7574-7582, 2004.

MC EWEN, J. G.; RESTREPO, B. I.; SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Nuclear staining of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **J. Méd Vet Mycol**, v. 25, n. 5, p. 345-345, 1987.

MIJALJICA, D.; PRESCOTT, M.; DEVENISH, R. J. Different fates of mitochondria: alternative ways for degradation? **Autophagy**, v. 3, n. 1, p. 4-9, 2007.

MINGOT, J. M.; PENALVA, M. A.; FERNANDEZ-CANÓN, J. M. Disruption of *phacA*, an *Aspergillus nidulans* gene encoding a novel cytochrome P450 monooxygenase catalyzing phenylacetate 2-hydroxylation, results in penicillin overproduction. **J Biol Chem.**, v. 274, n. 21, p. 14545-14550, 1999.

MISSALL, T. A.; LODGE, J. K.; McEWEN, J. E. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. **Eukaryot. Cell**, v. 3, n. 4, p. 835-846, 2004.

MISSALL, T. A.; PUSATERI, M. E.; LODGE, J. K. Thiol Peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide em the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. **Mol. Microbiol.**, v. 51, n. 5, p. 1447- 1458, 2004.

MISSALL, T. A.; MORAN, J. M.; CORBETT, J. A.; LODGE, J. K. Distinct stress response of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in absence of the Thiol-Specific Antioxidant Tsa1. **Eukaryot. Cell.**, v.4, n.1, p. 202-208, 2005.

MISSALL, T. A.; PUSATERI, M. E.; DONLIN, M. J.; CHAMBERS, K. T.; CORBETT, J. A.; LODGE, J. K. Posttranslational, translational, and transcriptional responses to nitric oxide stress in *Cryptococcus neoformans*: implications for virulence. **Eukaryot. Cell.**, v. 5, n. 3, p. 518-529, 2006.

MONTE, D; SOMERVILLE, S. Isolation of total RNA from plant tissue using trizol. In: BOWTELL, David; SAMBROOK, Joseph. **DNA Microarrays – A Molecular Cloning Manual**. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002, protocolo 3, p. 120-123.

MONTE, S. M de la.; JHAVERI, A.; MARON, B. A.; WANDS, J. R. Nitric oxide synthase 3-mediated neurodegeneration after intracerebral gene delivery. **J. Neuropathol Exp. Neurol.** v. 66, n. 4, p. 272-83, 2007.

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.

MOREIRA-FILHO, C. A.; ALEMIDA, S. V. Genoma Clínico – O impacto da genética genômica na prática médica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Encarte Especial. p. 162-1667. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/>. Acesso em: 01 mar. 2007.

MULLER, M.; GAULEY, J.; HEIKKILA, J. J. Hydrogen peroxide induces heat shock protein and proto-oncogene mRNA accumulation in *Xenopus laevis* A6 kidney epithelial cells. **Can J. Physiol. Pharmacol.**, v. 82, n. 7, p. 523-529, 2004.

MUN, H. S.; AOSAI, F.; NOROSE, K.; CHEN, M.; HATA, H.; TAGAWA, Y.; IWAKURA, Y.; BYUN, D. S.; YANO, A. Toxoplasma gondii Hsp70 as a danger signal in *Toxoplasma gondii*-infected mice. **Cell Stress Chaperones**, v. 5, n. 4, p. 328-335, 2000.

NAGL, M.; HESS, M. W.; PFALLER, K.; HENGSTER, P.; GOTTARDI, W. Bactericidal activity of micromolar N-clorotaurine: evidence for its antimicrobial fuction in the human defense system. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v .44, n. 9, p. 2507-2513, 2000.

NAGL, M.; GRUBER, A.; LEEL, C. P.; LEMBERGUER, E. M.; ZEPELIN, M. B.; WÜRZNER, R. Impact of N-chlorotaurine on viability and production of secreted aspartyl proteinases of *Candida* spp. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 6, p. 1996-1999, 2002.

NASCIMENTO, E.; MARTINEZ, R.; LOPES, A. R.; BERNARDES, L. A. S.; BARCO, C. P.; GOLDMAN, M. H. S.; TAYLOR, J. W.; McEWEN, J. G.; NOBREGA, M. P.; NOBREGA, F. G.; GOLDMAN, G. H. Detection and selection of microsatellites in the genome of *Paracoccidioides brasiliensis* as molecular markers for clinical and epidemiological studies. **Clin Microbiol**, v. 42, n. 11, p. 5007-5014, 2004.

NASCIMENTO, F. R. F.; CALICH, V. L. G.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M. Dual Role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **J Immunol.**, v. 168, n. 9, p. 4593-4600, 2002.

NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **PNAS**, v. 97, n. 16, p. 8841-8848, 2000.

NEDOSPASOV, A.; RAFIKAV, R.; BEDA, N.; NUDIER, E. An autocatalytic mechanism of protein nitrosylation. **PNAS**, v. 97, n. 25, p. 13543-13548, 2000.

NEMECEK, J. C.; WÜTHRICH, M.; KLEIN, B. Global control of dimorphism and virulence in fungi. **Science**, v. 312, n. 5773, p. 583-588, 2006.

NICOTERA, P.; BERNASSOLA, F.; MELINO, G. Nitric oxide (NO), a signaling molecule with a killer soul. **Cell Death Differ**, v. 6, n. 10, p. 931-933, 1999.

NITTLER, M. P.; HOCKING-MURRAY, D.; FOO, C. K.; SIL, A. Identification of *Histoplasma capsulatum* transcripts induced in response to reactive nitrogen species. **Mol Biol Cell**, v. 16, n. 10, p. 4792-4813, 2005.

NUNES, L. R.; DE OLIVEIRA, R. L. B. C.; LEITE, D. B.; DA SILVA, V. S.; MARQUES, E. R.; FERREIRA, M. E. S.; RIBEIRO, D. C. D.; BERNARDES, L. A. S.; GOLDMAN, M. H. S.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R.; BATISTA, W. L.; NÓBREGA, M. P.; NÓBREGA, F. G.; YANG, D. Y.; PEREIRA, C. A. B.; GOLDMAN, G. H. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing the Mycelium-to-Yeast transition. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 12, p. 2115-2128, 2005.

PENTTILA, K. E. Role of cysteine and taurine in regulating glutathione synthesis by periportal and perivenous hepatocytes. **Biochem. J.**, v. 269, n. 3, p. 659-664, 1990.

PFEILSCHIFTER, J.; EBERHARDT, W.; HUWILER, A. Nitric oxide and mechanisms of redox signaling. **J. Am. Soc. Nephrol**, v. 14, n. 8, p. 237- 240, 2003.

PRIAULT, M.; SALIN, B.; SCHAEFFER, J.; VALLETTE, F. M.; DI RAGO, J. P.; MARTINO, J. C.; Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast. **Cell Death Differ.**, v. 12, n.12, p. 1613-1621, 2005.

PUBCHEM. Information of biological activities of small molecules – **S-Nitrosoglutathione**. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=104858>. Acesso em: 01 abr. 2007.

QUAGLIATO, R. J.; GRANGEIA, T. A. G.; MASSUCIO, R. A. C.; CAPITANI, E. M.; REZENDE, S. M.; BALTHAZ, A. B. Associação entre paracoccidioidomicose e tuberculose: realidade e erro diagnóstico. **J Bras Pneumol**, v.33, n. 3, p. 295-300, 2007.

QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Quím. Nova**, v. 22, n. 4, p. 584-590, 1999.

RAJEEVAN, M. S.; VERNON, S. D.; TAYASAVANG, N. UNGER, E. R. Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. **J Mol Diagn**. v. 3, n. 1, p. 26-31, 2001.

RESTREPO, A.; SALAZAR, M. E.; CANO, L. E.; STOVER, E. P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D. A. Estrogens inhibit Mycelium-to-Yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 46, n. 2, p. 346-353, 1984.

RESTREPO, A.; McEWEN, J. G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med Mycol.**, v. 39, n. 3, p. 233-241, 2001.

RHEE, K. Y.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; NATHAN, C. F. S-nitroso proteome of *Mycobacterium tuberculosis*: enzymes of intermediary metabolism and antioxidant defense. **PNAS**, v. 102, n. 2, p. 467-472, 2005.

ROONEY, P. J.; KLEIN, B. S. Macroreview. Linking fungal morphogenesis with virulence. **Cell Microbiol.**, v. 4, n. 3, p. 127-137, 2002.

SADAHIRO, A.; DIOGP, C. L.; OSHIRO, T. M.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Kinetics of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and IL-4 production by mononuclear cells stimulated with gp43

peptides, in patients cured of paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 2, p. 156-162, 2007.

SAEED, A.I.; SHAROV, V.; WHITE, J.; LI, J.; LIANG, W.; BHAGABATI, N.; BRAISTED, J.; KLAPA, M.; CURRIER, T.; THIAGARAJAN, M.; STURN, A.; SNUFFIN, M.; REZANTSEV, A.; POPOV, D.; RYLTSOV, A.; KOSTUKOVICH, E.; BORISOVSKY, I.; LIU, Z.; VINSAVICH, A.; TRUSH, V.; QUACKENBUSH, J. TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. **Biotechniques**, v. 34, n. 2, p. 374-378, 2003.

SAHOO, R.; SENGUPTA, R.; GHOSH, S. Nitrosative stress on yeast: inhibition of glyoxalase-I and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the presence of GSNO. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 32, n. 4, p. 665-670, 2003.

SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G.; GIL, F. Production and regeneration of protoplast from the Y-fase of de human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 32, n. 5, p. 381-388, 1994.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In: CIHLAR, R. L.; CALDERONE, R. A. **Fungal pathogenesis: principles and clinical applications**. New York: Marcel Dekker Inc., 2001.

SASAKI, Y.; ASAMIZU, E.; SHIBATA, D.; NAKAMURA, Y.; KANEKO, T.; AWAI, K.; AMAGAI, M.; KUWATA, C; TSUGANE, T.; MASUDA, T.; SHIMADA, H.; TAKAMIYA, K.; OHTA, H.; TABATA, S. Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis* by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. **DNA Res.**, v. 8, n. 4, p. 153-161, 2001.

SCHAPIRO, J. M.; LIBBY, S. J.; FANG, F. C. Inhibition of bacterial DNA replication by zinc mobilization during nitrosative stress. **PNAS**, v. 100, n. 14, p. 8496-8501, 2003.

SCOTT, G. S.; SPITSIN, S. V.; KEAN, R. B.; MIKHEEVA, T.; KOPROWSKI, H.; HOOPER, D. C. Therapeutic intervention in experimental allergic encephalomyelitis by administration of uric acid precursors. **PNAS**, v. 99, n. 25, p. 16303-16308, 2002.

SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; SIBLEY, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 1, p. 40-79, 1999.

SHEU, F. S.; ZHU, W.; FUNG, P. C. W. Direct observation of trapping and release of nitric oxide by glutathione and cysteine with electron paramagnetic resonance spectroscopy. **Biophys J**, v. 78, n. 3, p. 1216-1226, 2000.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; FILHO, F. Q. T.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. Consenso em paracoccidioidomicose. **Rev Soc Bas Med Trop**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.

SILVA, J. S.; MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. **Front Biosci.**, v. 1, n. 8, p. 14-24, 2003.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R. Inquérito epidemiológico com paracoccidioidina e histoplasmina em área agrícola de café em Ibiá, Minas Gerais, Brasil. **Rev. Iberoam Micol**, v.15, n. 4, p. 294-297, 1998.

da SILVA, S. P.; BORGES-WALMSLEY, M. I.; PEREIRA, I. S.; SOARES, C. M. A.; WALMSLEY, A. R.; FELIPE, M. S. S. Differential expression of an hsp70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mol Microbiol.**, v. 31, n. 4, p. 1039-1050, 1999.

SIMON, D. I.; MULLINS, M. E.; JIA, L.; GASTON, B.; SINGEL, D. J.; STAMLER, J. S. Polynitrosylated proteins: characterization, bioactivity, and functional consequences. **PNAS**, v. 93, n.10, p. 4736 - 4741, 1996.

SINGER-VERMES, L. M.; BURGER, E.; FRANCO, M. F.; DI-BACCHI, M. M.; MENDES-GIANINNI, M. J.; CALICH, V. L. G. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 27, n. 2 p.71-82, 1989.

SINGH, R. J.; HOGG, N.; JOSEPH, J.; KALYANARAMAN, B. Mechanism of nitric oxide release from s-nitrosothiols. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 31, p. 18596-18603, 1996.

SINGH, S. P.; WISHNOK, J. S.; KESHIVE, M.; DEEN, W. M.; TANNENBAUM, S. R. The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system. **PNAS**, v. 93, n. 25, p. 14428-14433, 1996.

SKINNER, K. A.; WHITE, C. R.; PATELI, R.; TANI, S.; BARNESI, S.; KIRK, M.; DARLEY-USMARI, V.; PARKS, D. A. Nitrosation of Uric Acid by Peroxynitrite - formation of a vasoactive nitric oxide donor. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 38, p. 24491-24497, 1998.

SOUTHERN, E.; MIR, K.; SHCHEPINOV, M. Molecular interactions on microarrays. **Nat. Genet.**, v. 21, suplemento 1, p. 5-9, 1999.

SOUTO, P. C.; BRITO, V. N.; GAMEIRO, J.; DA CRUZ-HOFLING, M. A.; VERINAUD, L. Programmed cell death in thymus during experimental paracoccidioidomycosis. **Med Microbiol Immunol.** v. 192, n. 4, p. 225-229, 2003.

SOUTO, P. C. S. **Paracoccidioidomicose Experimental: Infecção e doença em animais infectados por um isolado atípico da cepa Pb 18.** Campinas, 2006. 136p. Tese de Doutorado – Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas.

SQUADRITO, G. L.; CUETO, R.; SPLENSER, A. E.; VALAVANIDIS, A.; ZHANG, H.; UPPU, R. M.; PRYOR W. A. Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid. **Arch Biochem Biophys,** v. 376, n. 2, p. 333-337, 2000.

STEFFEN, M.; SARKELA, T. M.; GYBINA, A. A.; STEELE, T. W.; TRASSETH, N. J. Metabolism of S-nitrosoglutathione in intact mitochondria. **Biochem. J.** v. 356, pt. 2, p. 395-402, 2001.

STRAYER, A.; WU, Z.; CHRISTEN, Y.; LINK, C. D.; LUO, Y. Expression of the small heat-shock protein Hsp-16-2 in *Caenorhabditis elegans* is suppressed by Ginkgo biloba extract EGb 761. **Faseb J.,** v. 17, n. 15, p. 2305-2307, 2003.

SU, L. J.; CHANG, C. W.; WU, Y. C.; CHEN, K. C.; LIN, C. J.; LIANG, S. C.; LIN, C. H.; WHANG-PENG, J.; HSU, S. L.; CHEN, C. H.; HUANG, C. Y. Selection of DDX5 as a novel internal control for Q-RT-PCR from microarray data using a block bootstrap re-sampling scheme. **BMC Genomics,** v. 8, n. 140, 2007.

TABORDA, C. P.; JULIANO, M. A.; PUCCIA, R.; FRANCO, M.; TRAVASSOS, L. R. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c Mice. **Infect Immun,** v. 66, n. 2, p. 786-793, 1998.

TAPPAZ, M. L. Taurine biosynthetic enzymes and taurine transporter: molecular identification and regulations. **Neurochem Res.,** v. 29, n. 1, p. 83-96, 2004.

THE UNIVERSITY OF ADELAIDE. Mycology Online – **Paracoccidioidomycosis.** Disponível em: http://www.mycology.adelaide.edu.au/Mycoses/Dimorphic_systemic/Paracoccidioidomycosis/. Acesso em : 01 mar. 2007.

TORRES, J.; DARLEY-USMAR, V.; WILSON, M. T. Inhibition of cytochrome c oxydase in turnover by nitric oxide: mechanism and implications for control of respiration. **Biochem. J.,** v. 312, pt. 1, p. 169-173, 1995.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

TZOUVELEKIS, A.; PATLAKAS, G.; BOUROS, D. Application of microarray technology in pulmonary diseases. **Respir Res.**, v. 5, n. 1, p. 26-34, 2004.

ULLMANN, B. D.; MYERS, H.; CHIRANAND, W.; LAZZELL, A. L.; ZHAO, Q.; VEGA, L. A.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; GARDNER, P. R.; GUSTIN, M. C. Inducible defense mechanism against nitric oxide in *Candida albicans*. **Eukaryot. Cell**, v. 3, n. 3, p. 715-723, 2004.

VENKETARAMANM, V.; DAYARAM, Y. K.; TALAUE, M. T.; CONNELL, N. D. Glutathione and nitrosoglutathione in macrophage defense against *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 3, p. 1886-1889, 2005.

VERINAUD, L.; SOUTO, P. C. S.; BRITO, V. N. Thymic atrophy in infectious diseases. **Braz. J. Morphol. Sci.** v. 21, n. 2, p. 111-116, 2004.

WANG, P. G.; XIAN, M.; TANG, X.; WU, X., WEN, Z., CAI, T., JANCZUK, A. J. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. **Chem Rev**, v. 102, n. 4, p. 1091-1134, 2002.

WORKMAN, G.; JENENSEN, L. J.; JARMER, H.; BERKA, R.; GAUTIER, L.; NIELSER, H. B.; SEXILD, H. H.; NIELSEN, C.; BRUNAK, S.; KNUDSEN, S. A new non-linear normalization method for reducing variability in DNA microarray experiments. **Genome Biol.**, v. 3, n. 9, 2002.

YASUKO, F.; HIDEKI, T.; YUKO, G. H.; KAORU, T. Heat shock-inducible expression vectors for use in *Schizosaccharomyces pombe*. **FEMS Yeast Res.**, v. 6, n. 6, p. 883-887, 2006.

ZAKI, M. H.; AKUTA, T.; AKAIKE, T. Nitric oxide-induced nitrate stress involved in microbial pathogenesis. **J. Pharmacol Sci**, v. 98, n. 2, p. 117-129, 2005.

ZAVASCKI, A. P.; BIENARDT, J. C.; SEVERO, L. C. Paracoccidioidomycosis in organ transplant recipient: case report. **Rev Inst Med Trop S. Paulo**, v. 46, n. 5, p. 279-281, 2004.

ZHU, S.; MANUEL, M.; TANAKA, S.; CHOE, N.; KAGAN, E.; MATALON, S. Contribution of reactive oxygen and nitrogen species to particulate-induced lung injury. **Environ Health Perspect**, v. 106, supplement 5, p. 1157-1163, 1998.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)