

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

Milce Costa

**Análise do transcriptoma de *Paracoccidioides brasiliensis*
no processo infectivo**

**Orientadora:
Profª. Drª. Célia Maria de Almeida Soares**

**Tese de Doutorado apresentada ao Curso Pós-Graduação
em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e
Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, como
requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em
Medicina Tropical. Área de concentração: Microbiologia.**

**Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade
Federal de Goiás.**

Goiânia-GO, 2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

BANCA EXAMINADORA

Titulares:

Prof^a. Dr^a. Célia Maria de Almeida Soares - Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Goiás.

Prof^a. Dr^a. Maristela Pereira - Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Goiás.

Prof^a. Dr^a. Patrícia Cisalpino - Universidade Federal de Minas Gerais / Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biológicas.

Prof^a. Dr^a. Márcia Giambiagi de Marval - Universidade Federal do Rio de Janeiro / Departamento de Microbiologia Médica - Instituto de Microbiologia.

Prof. Dr. Cirano José Ulhôa - Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Goiás.

Suplentes:

Prof. Dr. Ivan Torres Nicolau de Campos - Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Goiás.

Prof^a. Dr^a Maria do Rosário Rodrigues Silva - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública / Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz - Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Católica de Goiás.

Prof^a. Dr^a. Divina da Dores de Paula Cardoso - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública / Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dr. André Kipnis - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública / Universidade Federal de Goiás.

Aos meus queridos pais Maurício Alves Costa e Maria do Carmo Costa cujo amor incondicional foi, é e sempre será determinante em todas as etapas da minha vida. À minha irmãzinha Mariany, cuja doce presença ilumina meus dias. Ao grande amor da minha vida, Bruno Cézar, meu esposo, onde sei que certo encontrar paciência, paciência, paciência, paciência, paciência, paciência, carinho e muito bom humor sempre que preciso.

AGRADECIMENTOS

À Deus neste momento unicamente por me fazer tão perseverante.

À minha Orientadora Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares por sua inquestionável competência profissional, um exemplo de disciplina, empenho, seriedade e espírito científico para todos os seus orientados. Certamente seus alunos adquirem sob sua orientação o verdadeiro sentido da palavra profissionalismo. Agradeço ainda pela oportunidade de trabalhar em um laboratório preocupado em obter recursos financeiros para o desenvolvimento profissional dos seus alunos e comprometido com o bem público, onde se procura justificar, em forma de publicações, o suporte financeiro recebido.

À Profa Dra. Maristela Pereira, por sua importante colaboração neste estudo, disposição para o trabalho, dedicação sem limites e por ser uma pessoa tão acessível.

À Profa Dra. Fabrícia Paula de Faria, por sua simpatia e atenção sempre que precisávamos e por sua colaboração na fase inicial deste trabalho.

Aos meus queridos amigos Clayton Luiz Borges e Alexandre Melo Baílão por serem tão dispostos, prestativos e pacientes comigo em todas as etapas deste trabalho. Vocês carregam dentro de si a alma de pesquisadores. Obrigada pelos muitos momentos de estudo e de descontração. “Sinceramente!”

Aos meus “filhinhos” Yuri de Abreu Mendonça e Gabriela Vaz Meirelles (os melhores estagiários do mundo) por toda doação a este trabalho, pela dedicação, disciplina e empenho exemplares. Por todos os momentos em que me socorreram. Mas principalmente, por toda paciência que tiveram comigo! “Calma cocada!”

À Sabrina F. I. M. Dantas, amiga de tantos anos, comadre e agora colaboradora neste estudo. Por sua disposição e dedicação no auxílio de muitos experimentos. Mas principalmente pelas longas conversas, sem as quais eu teria que pagar um terapeuta.

Aos amigos Rogério Bento Fiúza e Kleber Silvestre Diogo, que muito contribuíram para esse trabalho nos dando suporte na Bioinformática.

Aos amigos do coração que fiz no LBM, Karinne P. Bastos e Bruno Tacco, afinal o que se leva depois de quatro anos convivendo, se não o verdadeiro sentido da amizade!

A todos os alunos do Laboratório de Biologia Molecular: Aline, Bernadete, Cristielly, Cristina, Elisa Flávia, Juliana, Kelly, Kesser, Lidiane, Mariana, Mirele, Mônica Oliveira, Mônica Santiago, Nadya, Nathalie, Netto, Patrícia Kott, Patrícia Lima, Patrícia Zambuzzi, Raquel, Regilda, Rodrigo, Ronney, Rogério Fraga, Sarah e Wesley pela boa convivência, apoio e colaboração.

Ao secretário da pós-graduação José Oliveira Neto (Zezinho) por sua disponibilidade e atenção sempre que precisei.

A todos que de alguma maneira estiveram envolvidas neste trabalho e que me auxiliaram profissional ou pessoalmente.

A todos, meu muito obrigado!

“Nunca considerem seus estudos como um dever, mas como uma invejável oportunidade de aprenderem a conhecer a influência libertadora da beleza no reino do espírito, para sua própria alegria pessoal e para benefício da comunidade a que pertencerá o trabalho posterior de vocês.”

(Albert Einstein 1879-1955)

SUMÁRIO

	Página
Resumo.....	IX
Abstract.....	XI
I - Introdução.....	13
1 - Considerações Gerais.....	13
2 - Transcriptomas de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>.....	19
II - Justificativa.....	30
III - Objetivos Específicos.....	31
IV – Referências Bibliográficas.....	33
V – Manuscrito.....	46
VI – Conclusões.....	90
VII - Perspectivas	94

VIII

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis é um importante patógeno humano que causa a paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica com ampla distribuição na América Latina. O fungo é termo dimórfico, isto é, cresce como levedura nos tecidos do hospedeiro ou quando cultivado a 36°C e como micélio em condições sapróbias ou quando cultivado a temperatura ambiente (18–23°C). A transição de micélio para levedura é um evento essencial no estabelecimento da infecção. A expressão de genes em *P. brasiliensis* tem sido amplamente estudada, mas ainda há muito a se esclarecer sobre as seqüências genômicas expressas por este fungo no processo infectivo. Para identificar genes associados com a infecção fúngica, foi realizada uma análise comparativa entre seqüências expressas por leveduras recuperadas de camundongos infectados e seqüências provenientes do transcriptoma de levedura e de micélio de *P. brasiliensis* (<https://dna.biomol.unb.br/Pb/>). Foi construída uma biblioteca de cDNA de leveduras recuperadas de fígado de camundongos infectados experimentalmente. Foram geradas 4.934 ESTs (Etiquetas de Seqüências Expressas) que foram agrupadas em 1.602 clusters, reunidos em 1.041 contigs e 561 singlets. Análises comparativas evidenciaram 1.750 ESTs (35,47% do total de seqüências) correspondendo à: (i) novos transcritos relacionados a vias metabólicas; (ii) relacionados à produção de energia; (iii) relacionados à virulência e transporte celular. Do total de ESTs geradas neste estudo, 3.184 ESTs (64,53% das seqüências descritas) também estavam presentes no transcriptoma de levedura e micélio de células obtidas de cultura *in vitro* (<https://dna.biomol.unb.br/Pb/>). Entre os transcritos previamente descritos foi possível identificar transcritos super-regulados durante o processo infectivo, compreendendo 1.172

ESTs (23,75% de seqüências descritas). A demonstração do perfil gênico das células leveduriformes de *P. brasiliensis* recuperadas de animais infectados é um requisito essencial para o estudo do genoma funcional de modo a esclarecer os mecanismos de patogenicidade e virulência fúngica.

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis a important human pathogen causing paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis with broad distribution in Latin America. The fungus is thermo-dimorphic, that is, it grows as a yeast-like structure in the host tissue or when cultured at 36°C, and as mycelium in the saprobic condition or when cultured at room temperature (18-23°C). The transition from mycelium to yeast cells is a crucial event in the establishment of infection. Although gene expression in *P. brasiliensis* has been studied, little is known about the genome sequences expressed by *P. brasiliensis* in the infective process. To identify genes associated with the fungal infection a comparative analysis was performed between putative unigene sequences of *P. brasiliensis* yeast cells recovered from infected mice and the database constructed with fungal sequences of the yeast and mycelium transcriptome at (<https://dna.biomol.unb.br/Pb/>). To examine extensively the transcripts expressed by *P. brasiliensis* in the infective process, we have constructed a cDNA library from yeast fungal cells post-infection of liver mice. We generated 4.934 expressed sequence tags (ESTs) from a cDNA library. All the ESTs were clustered into 1602 clusters that were assembled into 1.041 contigs sequences and 561 singletons. Comparative analysis of *P. brasiliensis* unisequences databases through the approach mentioned above produced 1.750 sequences (35.47% of the total) representing novel transcripts of *P. brasiliensis*. Through these sequences we found: (i) novel genes related to metabolic routes; (ii) novel transcripts putatively implicated in energy production; (iii) novel transcripts implicated in cell rescue and transport. From the total, 3.184 ESTs (64.53% of the described sequences) were also present in the transcriptome of yeast and

mycelium cells obtained from *in vitro* cultures (<https://dna.biomol.unb.br/Pb/>). Among the previously described transcripts it was possible to identify over regulated transcripts during the infective process, comprising 1.172 ESTs (23.75% of the described sequences). Gene cataloguing and profiling of *P. brasiliensis* yeast cells recovered from infected animal tissues is an essential requisite to provide molecular reagents for functional genome studies needed for elucidating mechanisms of fungal virulence and pathogenicity.

I - INTRODUÇÃO

1 - Considerações Gerais

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* isolado pela primeira vez em 1908 por Adolpho Lutz, é o agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica restrita a países da América Latina com aproximadamente 80% dos casos relatados no Brasil (Restrepo *et al.* 2001). Estima-se que 10 milhões de indivíduos no mundo estejam infectados e que 2% das pessoas acometidas possam desenvolver a doença (McEwen *et al.* 1995). No Brasil, em áreas classificadas como altamente endêmicas, presume-se que a taxa de incidência anual da doença seja de 1 a 3 casos por 100.000 habitantes (Restrepo-Moreno & Greer 1983, Londero & Ramos 1990). Entre os anos de 1980 a 1995, a PCM foi descrita como a 8^a causa de mortalidade entre as infecções predominantes no país com uma taxa de mortalidade média anual de 1,45/milhão de habitantes, sendo o estado do Paraná o mais atingido (Coutinho 1999, Coutinho *et al.* 2002). A PCM atinge principalmente trabalhadores rurais, residentes em áreas endêmicas, do sexo masculino, na faixa etária entre 30 e 60 anos (Villar *et al.* 2000).

O fungo *P. brasiliensis* foi inicialmente classificado como um fungo imperfeito, pertencente ao filo anamórfico Deuteromycota e à classe Hyphomycetos. Há alguns anos, existiam muitos problemas em relação à classificação dos fungos que não apresentavam estruturas sexuais, mas o recente avanço das metodologias moleculares têm

ajudado na classificação taxonômica de vários fungos de importância médica (San-Blas *et al.* 2002). A caracterização do *P. brasiliensis* como pertencente ao filo Ascomycota, mesmo não se conhecendo a fase teleomórfica, foi realizada por Leclerc *et al.* (1994) através de comparação entre seqüências de DNA da subunidade ribossomal maior (28S) de dermatófitos e fungos dimórficos. Guého *et al.* (1997) realizaram posteriormente comparações entre seqüências parciais de rRNA de fungos dimórficos, classificando o fungo *P. brasiliensis* juntamente com os gêneros *Histoplasma*, *Emmonsia* e *Blastomyces*, como pertencentes à família Onygenaceae. Recentemente análises filogenéticas realizadas com seqüências da subunidade ribossomal menor de vários fungos reforçou a tese de que *P. brasiliensis* deveria ser agrupado na ordem Onygenales (Bialek *et al.* 2000).

A atual classificação taxonômica do *P. brasiliensis* é: reino Fungi, filo Ascomycota, subdivisão Euascomycotina, classe Plectomyceto, subclasse Euascomycetidae, ordem Onygenales, família Onygenaceae, subfamília Onygenaceae Anamórficos, gênero *Paracoccidioides*, espécie *brasiliensis* (San-Blas *et al.* 2002). Recentemente, Matute *et al.* (2006), descreveram a existência de três diferentes espécies filogenéticas de *P. brasiliensis*: S1 (espécie 1), PS2 (espécie filogenética 2) e PS3 (espécie filogenética 3). A espécie filogenética PS3 está geograficamente restrita à Colômbia, enquanto S1 está distribuída no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela. Alguns isolados da espécie filogenética PS2 foram encontrados no Brasil nos estados de São Paulo e Minas Gerais e ainda na Venezuela (Matute *et al.* 2006).

O local exato e as condições onde *P. brasiliensis* ocorre na natureza ainda são indeterminados em virtude de diversos fatores, tais como o raro isolamento do fungo do

ambiente, o prolongado período de latência no hospedeiro humano, bem como a não identificação de hospedeiro intermediário do fungo (Montenegro *et al.* 1996, Bagagli *et al.* 1998, 2006). Micélio e conídio provavelmente podem crescer saprofitamente no solo, na água, e em plantas à temperatura ambiente e são consideradas como formas infectivas do fungo (Restrepo *et al.* 2001). O fungo já foi isolado do solo em países como o Brasil (Montenegro *et al.* 1996), Argentina (Negroni 1966) e Venezuela (Albornoz 1971); de fezes de morcegos frugívoros (*Artibeus lituratus*) e de pinguim (Grose & Tamsitt 1965, Garcia *et al.* 1993); e de tatus, *Dasyurus novemcinctus* e *Cabassous centralis*, os quais são considerados hospedeiros silvestres do fungo (Bagagli *et al.* 1998, 2003, Corredor *et al.* 2005). A infecção natural em alguns animais selvagens e domésticos tem sido observada e manifestações clínicas da doença recentemente foram relatadas em cachorros (Ricci *et al.* 2004, Farias *et al.* 2005).

Restrepo (1970) realizou experimentos de cultivo do fungo em substratos encontrados na natureza e observou esporulação de *P. brasiliensis* com produção de conídeos, artroconídeos e aleuroconídeos de dimensões de 2 a 5 µm, o que seria apropriado para dispersão aérea do microrganismo e subsequente inalação pelo homem. A alta viabilidade e resistência destes esporos, mudanças de pH e de temperatura (Medina & Bodziak-Júnior 1949, Restrepo *et al.* 1969, Mendelovici *et al.* 1974) são fortes indícios de que o micélio seja a forma de vida saprofítica do fungo na natureza, bem como o estágio infectante (San-Blas 1993).

P. brasiliensis um fungo termodimórfico, transita entre as formas miceliana, saprófita, a qual presume-se que ocorra na natureza em temperaturas inferiores a 28°C, e

leveduriforme, que ocorre nos tecidos infectados à temperatura de 35°C a 37°C (San-Blas & San-Blas 1993). A transição entre as morfologias de micélio e levedura é parte do ciclo biológico do fungo e constitui-se em etapa essencial para o estabelecimento da infecção e para a fase inicial da interação do fungo com o hospedeiro. Evidências indicam que a infecção ocorre por inalação de propágulos aéreos que se convertem na fase leveduriforme, nos pulmões (Franco 1987).

A transição de micélio para levedura pode ser induzida *in vitro* meramente pela mudança na temperatura de incubação de 26°C para 36°C. Morfológicamente, a transição *in vitro* de micélio para levedura em *P. brasiliensis* é caracterizada pelo espessamento das regiões inter-septais das hifas, com o surgimento de estruturas arredondadas, que se dividem por brotamento (San-Blas 1982). No processo inverso, levedura para micélio, *in vitro*, ocorre a formação de brotos alongados, multinucleados, em forma de pêra, os quais gradativamente assumem o aspecto de uma hifa (Bartinick-Garcia *et al.* 1995).

A conversão morfogenética em *P. brasiliensis* está correlacionada com mudanças na composição da parede celular. Estudos citoquímicos e estruturais da parede celular do fungo em suas duas formas foram realizados confirmado a presença de polímeros de α -1,3-glucana em leveduras prioritariamente e, β -1,3-glucana em micélio (Paris *et al.* 1986). Quitina é encontrada em ambas as formas do fungo (San-Blas *et al.* 1987, Kurokawa *et al.* 1998) apresentando um maior teor em levedura quando comparado a micélio. Durante a transição de micélio para levedura ocorre a mudança do polímero de β -1,3-glucana para α -1,3-glucana (Kanetsuna *et al.* 1969). Estudos realizados com isolados de *P. brasiliensis* sugerem que a α -1,3-glucana na fase leveduriforme protege o fungo contra

as enzimas do sistema de defesa do hospedeiro (San-Blas 1985). San-Blas (1982) sugere que os fagócitos humanos produzam β -1,3-glucanase capaz de digerir somente β -1,3-glucana presente na parede celular da forma miceliana do fungo. Entretanto, a transformação de micélio para levedura logo no início da infecção, devido ao maior teor α -1,3-glucana, deve proteger o patógeno contra a ação das enzimas β -glucanases fagocitárias permitindo a instalação do fungo na forma leveduriforme e estabelecendo-se a infecção.

Um dos aspectos da inter relação entre o parasito e o hospedeiro é o efeito de hormônios no dimorfismo do fungo. A alta incidência de PCM em adultos masculinos sugere que fatores hormonais possam desempenhar algum papel na patogênese da doença (Sano *et al.* 1999). O hormônio feminino 17- β -estradiol tem sido relacionado à diferenciação de *P. brasiliensis*. Estudos prévios mostraram que o hormônio estrogênio é capaz de inibir a transição de micélio para levedura de maneira dose-dependente *in vitro* (Restrepo 1985), e *in vivo* (Sano *et al.* 1999). Aristizabal *et al.* (2002) observaram *in vivo* a participação do hormônio feminino na resistência de fêmeas de rato durante o desenvolvimento inicial da PCM. Felipe *et al.* (2005) descreveram um gene preferencialmente expresso na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* que possivelmente codifica uma proteína de ligação previamente caracterizada por Loose *et al.* (1983). A EBP (Estradiol Binding Protein) possui interação seletiva a estrogênios ligando-se ao estradiol (Loose *et al.* 1983, Clemons *et al.* 1989). Acredita-se que a interação do hormônio 17- β -estradiol com a EBP citoplasmática inibe a transição de micélio para levedura, explicando a baixa incidência da PCM em mulheres.

Componentes das vias de sinalização celular parecem estar estreitamente relacionados com a expressão de genes responsáveis pela virulência e diferenciação de

organismos patogênicos. No entanto, as vias de sinalização que controlam a transição morfológica em *P. brasiliensis* ainda são pouco conhecidas. A via de sinalização através do cAMP parece ser importante, pois a adição exógena do composto inibe a transição de levedura para micélio, mantendo a forma patogênica do fungo (Paris *et al.* 1985). A via de transdução Ca²⁺/Calmodulina também parece desempenhar papel na diferenciação celular de *P. brasiliensis*. Drogas que bloqueiam as quinases dependentes de Ca²⁺/Calmodulina inibem a diferenciação de micélio para levedura (Carvalho *et al.* 2003). Entretanto, a complexidade da regulação da patogênese em *P. brasiliensis* requer futuros estudos para cada elemento de sinalização.

Silva *et al.* (1994) caracterizaram a transição *in vitro* entre as formas miceliana e leveduriforme do isolado *Pb* 01 (ATCC-MYA-826). Alterações na síntese protéica foram descritas durante a transição de fases do isolado *Pb* 01 (Silva *et al.* 1994, Salem-Izacc *et al.* 1997). A expressão de proteínas durante o processo de diferenciação apresenta um padrão específico para diferentes isolados do fungo (Salem-Izacc *et al.* 1997). Alguns genes de *P. brasiliensis*, já caracterizados, apresentam expressão diferencial durante a transição dimórfica do fungo. O gene codificante para as proteínas HSP70 (Silva *et al.* 1999), Pb Y20 (Cunha *et al.* 1999), HSP60 (Salem-Izacc *et al.* 2001, Cunha *et al.* 2002), ClpB (Jesuíno *et al.* 2002), manosiltransferase (Costa *et al.* 2002), catalase P (Moreira *et al.* 2004) e gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (Barbosa *et al.* 2004) apresentam baixos níveis de expressão na forma miceliana quando comparados com a forma leveduriforme, sugerindo que estas proteínas sejam necessárias para sobrevida de *P. brasiliensis* nas condições térmicas do hospedeiro e que possam desempenhar papel na morfogênese do fungo.

2 - Transcriptomas de *P. brasiliensis*

Visando conhecer um maior número de genes de *P. brasiliensis*, diferentes abordagens no estudo de transcriptomas têm sido aplicadas. Um Projeto Genoma Funcional de *P. brasiliensis*, desenvolvido por um consórcio de laboratórios da região Centro–Oeste do Brasil (Projeto Genoma Funcional e Diferencial de *Paracoccidioides brasiliensis*), resultou no seqüenciamento de 25.511 ESTs derivadas de bibliotecas de cDNA de levedura e micélio, abrangendo aproximadamente 80% do número total de genes estimados para este fungo (Felipe *et al.* 2003, 2005). O trabalho possibilitou a detecção de genes diferencialmente expressos nas fases de *P. brasiliensis*. Genes de virulência e possíveis alvos para drogas foram identificados através de análises comparativas com outros fungos patogênicos humanos, tais como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*. Os autores descreveram ainda o perfil metabólico diferencial exibido por *P. brasiliensis* nas formas miceliana e leveduriforme. Em geral, micélio apresenta metabolismo aeróbio, uma vez que durante a fase saprofítica, genes que codificam enzimas que participam da fosforilação oxidativa, como a isocitrato desidrogenase e succinil coenzima A sintase, estão altamente expressos. Ao contrário, a fase leveduriforme apresenta metabolismo anaeróbio. Nesta fase, os altos níveis de expressão da álcool desidrogenase I favorecem a fermentação alcoólica e consequente produção de etanol (Felipe *et al.* 2005).

Neste estudo foram identificados 48 transcritos codificando chaperonas ou proteínas envolvidas no processo de estresse, descritas inicialmente como proteínas de choque térmico (HSP – heat shock protein). Estas proteínas estão envolvidas em processos

biológicos como transição dimórfica e imunopatogenicidade de doenças infecciosas. O número de genes envolvidos no processo de choque térmico é 38% maior na biblioteca de cDNA de levedura quando comparado à biblioteca de micélio. Esse fato é compatível com a maior temperatura (36°C) de crescimento de células leveduriformes em relação ao micélio (Felipe *et al.* 2005). Muitas chaperonas de *P. brasiliensis* foram identificadas, visto que até aquele momento, somente 8 HSPs haviam sido previamente descritas para este patógeno.

Outro projeto Genoma Funcional foi desenvolvido por pesquisadores do Estado de São Paulo. Através da análise de ESTs, Goldman *et al.* (2003) identificaram vários genes de virulência de *P. brasiliensis* (isolado *Pb* 18) homólogos a *C. albicans*. Os genes da via de transdução de sinal têm sido implicados na transição dimórfica. A identificação de alguns genes de *P. brasiliensis* homólogos à via de transdução relacionados à virulência de *C. albicans*, como CST20, CPP1 e CEK1 encontrados neste estudo, sugerem que estas vias possam estar atuando em *P. brasiliensis*, provavelmente controlando a mudança morfológica. No entanto, o envolvimento destes genes na transição dimórfica e/ou virulência requerem demonstração experimental apropriada. Neste estudo, os pesquisadores analisaram ainda a expressão de alguns genes durante a transição dimórfica e detectaram que transcritos de três proteínas de choque térmico (HSP-70, HSP-82 e HSP-104), de um homólogo da delta-9-desaturase (OLE1) e da oxidase alternativa, possuem picos de expressão durante a transição de micélio para levedura, sugerindo que a estabilização de proteínas e mudanças na organização da membrana são fatores importantes na transição morfológica de micélio para a forma de levedura (Goldman *et al.* 2003).

Marques *et al.* (2004) identificaram genes preferencialmente expressos na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* (isolado *Pb* 18), proporcionando maiores informações

acerca da patobiologia deste fungo. A mudança morfológica mais reconhecida em *P. brasiliensis* é a alteração entre os anômeros de glucana que passam de β -1,3- para α -1,3-glucana, assim que o fungo adota a forma leveduriforme (San-Blas & Niño-Vega 2001). Desta forma, observa-se uma expressão muito maior do gene que codifica a α -1,3- glucana sintetase na fase de levedura do que na de micélio. Relatos antigos do estudo da transição de micélio para levedura em *H. capsulatum* atribuíram um importante papel aos grupos sulfidrílicos, principalmente na forma de cisteína (Maresca and Kobayashi 2000). Hwang *et al.* (2003) ampliaram essas observações mostrando que o gene que codifica a enzima cisteína dioxigenase é mais expressa em levedura do que no micélio. Marques *et al.* (2004), verificaram a presença do gene *CDII* que codifica a cisteína dioxigenase em *P. brasiliensis*. Previamente, foi mostrado que células na fase miceliana de *P. brasiliensis* podem crescer na presença tanto de enxofre orgânico quanto inorgânico, enquanto que as células de levedura podem crescer somente em presença de aminoácidos contendo enxofre orgânico (Paris *et al.* 1985). Marques *et al.* (2004) confirma em seus experimentos a auxotrofia do isolado Pb18 para o enxofre orgânico. Esta auxotrofia ao enxofre orgânico sugere que além da temperatura, o enxofre orgânico é um importante estímulo para manter a fase leveduriforme patogênica de *P. brasiliensis*. Desta forma, verifica-se que diversos genes envolvidos na assimilação de aminoácidos que contêm enxofre, tais como metionina permease, são mais expressos na fase de levedura do que na de micélio, indicando um possível papel, como em *H. capsulatum*, para o metabolismo do enxofre na manutenção do estado de levedura (Marques *et al.* 2004). Nos experimentos de Marques *et al.* (2004), níveis aumentados de expressão do gene ERG25 são visualizados na fase de levedura. O

gene ERG25 codifica uma C-4 esterol metil oxidase que participa do primeiro passo enzimático da síntese de ergosterol em fungos. É provável que o aumento na expressão de ERG25 esteja correlacionado ao aumento da reutilização na membrana celular. Sugere-se que mudanças na membrana são importantes fatores na transição morfológica a 36°C (Goldman *et al.* 2003) e a alta reutilização de lipídios na membrana celular também pode contribuir para isso. Adicionalmente, já tem sido demonstrado através de análise global da expressão gênica em *S. cerevisiae* que os genes envolvidos na biossíntese de ergosterol têm a sua expressão aumentada em condições de estresse, incluindo o estresse oxidativo, e antifúngicos que têm como alvo a biossíntese de ergosterol (Higgins *et al.* 2003, Bammert & Fostel 2000). Permanece a ser determinado se os genes de biossíntese de ergosterol têm a sua expressão de RNAm aumentada a 36°C, ou se é um efeito específico do gene ERG25 (Marques *et al.* 2004).

A análise do transcriptoma de *P. brasiliensis* durante a transição dimórfica é atualmente objeto de estudo de pesquisadores (Nunes *et al.* 2005, Bastos *et al.* 2007). Nunes *et al.* (2005) avaliaram a expressão de genes de *P. brasiliensis* durante a transição de micélio para levedura. Avaliando as vias metabólicas de *P. brasiliensis*, estes autores verificaram a super expressão exacerbada da álcool desidrogenase I durante a transição dimórfica. Além disso, a piruvato decarboxilase, outra enzima envolvida na produção de etanol a partir do piruvato, também se apresentava super expressa no processo de diferenciação. Estes dados reforçam a idéia de que células leveduriformes possuem um metabolismo voltado para produção de etanol através da fermentação. Ao se avaliar o ciclo do glioxalato, experimentos de hibridização de microarranjos não mostraram alterações na expressão da isocitrato liase em cultura de micélio após 120 horas de transição de micélio

para levedura, ao contrário dos achados de Felipe *et al.* (2005). Entretanto, a expressão da malato sintase está aumentada nas células leveduriformes, reforçando a idéia de que o ciclo do gioxalato é mais ativo nesta forma de *P. brasiliensis*. Durante a transição da forma miceliana para leveduriforme de *P. brasiliensis*, verificou-se a alta expressão do gene que codifica uma para 4-hidroxil-fenil-piruvato dioxigenase (4-HPPD), proteína envolvida no catabolismo de aminoácidos. Este gene pode ser inibido pela adição de NTBC [2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoil)-ciclohexane-1,3-dione], assim como por seus derivados. A inibição de 4-HPPD provoca o bloqueio do crescimento e da diferenciação para a fase leveduriforme do fungo *in vitro* (Nunes *et al.* 2005).

O perfil transcripcional de *P. brasiliensis* durante a diferenciação morfológica de micélio para levedura foi avaliado por Bastos *et al.* (2007). Vários genes potencialmente relacionados com a síntese de membrana e parede celulares mostraram-se aumentados durante a diferenciação celular de micélio para levedura após 18 horas de indução da transição, sugerindo que *P. brasiliensis* favorece o remodelamento da membrana e de parede celulares nos estágios iniciais da morfogênese (Bastos *et al.* 2007). Neste estudo, genes envolvidos na via de assimilação do enxofre como a sulfito redutase, mostrou-se super expresso durante a transição, sugerindo o envolvimento do metabolismo do enxofre durante o processo de diferenciação em *P. brasiliensis*, como descrito anteriormente (Andrade *et al.* 2006; Ferreira *et al.* 2006). Durante a transição também foi verificada a presença de enzimas que participam do ciclo do gioxalato, como a isocitrato liase, malato desidrogenase, citrato sintase e aconitase. A presença destes transcritos durante a diferenciação indica que esta via é funcional durante esse processo. Também foram

identificados genes envolvidos em vias de transdução de sinal tais como MAPK, serina/treonina quinase e histidina quinase, sugerindo que a transição morfológica em *P. brasiliensis* é mediada por vias de transdução de sinal que controlam a adaptação ao ambiente para a sobrevivência e adaptação do fungo dentro do hospedeiro (Bastos *et al.* 2007).

Com o objetivo de descobrir genes possivelmente envolvidos na adaptação e sobrevivência de *P. brasiliensis* no hospedeiro durante a infecção, Bailão *et al.* (2006) utilizaram a Análise de Diferença Representacional de cDNA (cDNA-RDA) para identificar genes de *P. brasiliensis* induzidos durante o processo infectivo e em condições que mimetizavam a via hematológica de disseminação fúngica. Durante a infecção, o nível de ferro (Fe) disponível no hospedeiro é significativamente limitado e os mecanismos microbianos para sua aquisição são muito importantes para o sucesso da virulência. No modelo de infecção experimental foi observada a alta freqüência do transcrito zrt1 (zinco/ferro permease) (Bailão *et al.* 2006). O mesmo foi observado para o transcrito ctr3, codificando um transportador de cobre de alta afinidade, que sugere a exigência de uma permease cobre/ferro para o transporte do Fe. O transcrito ctr3 tem sido descrito como altamente expresso na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* por outros pesquisadores (Marques *et al.* 2004, Felipe *et al.* 2005). Surpreendentemente, quando células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram incubadas com sangue humano, zrt1 e crt3 não estavam super regulados, sugerindo uma condição não limitante de Fe nesta situação. A aquisição do Fe pode incluir também a redutase férrica para remover o Fe ligado às moléculas do hospedeiro como o grupo heme da hemoglobina (Bailão *et al.* 2006). Neste

estudo, o transcrito codificante para a glutamina sintase (*gln1*) foi fortemente induzido após incubação com sangue humano, sugerindo que a remodelação na parede/membrana celular possa ser um dos caminhos pelos quais *P. brasiliensis* responda às mudanças de osmolaridade externa encontradas pelo fungo na via de disseminação sanguínea (Bailão *et al.* 2006). A síntese de quitina mostra-se essencial na resposta compensatória ao estresse de parede celular nos fungos impedindo a morte celular (Popolo *et al.* 1997).

Bailão *et al.* (2006) também verificaram em seus experimentos que alguns fatores de virulência, já descritos em outros fungos patogênicos, apresentaram-se super regulados nos camundongos infectados. A gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) apresentou-se super regulada principalmente em células fúngicas recuperadas de modelos experimentais. A GAPDH é uma adesina que se liga a componentes da matriz extracelular e é capaz de mediar a aderência e internalização de *P. brasiliensis* em cultura de células *in vitro*, sugerindo seu envolvimento na patogênese deste fungo (Barbosa *et al.* 2006). Transcriptos codificantes para tirosinase e decarboxilase para aminoácido aromático também se apresentaram super regulados em células leveduriformes de *P. brasiliensis* extraídas do fígado de camundongos infectados, ambas enzimas estão implicadas na patogênese de infecções microbianas como descrito para *C. neoformans* e *P. brasiliensis* (Gómez *et al.* 2001, Walton *et al.* 2005).

Recentemente, Bailão *et al.* (2007) desenvolveram estudos no sentido de analisar leveduras de *P. brasiliensis* tratadas com plasma humano, simulando assim um sítio de infecção superficial, com inflamação. Foi observado um aumento significativo na expressão de transcriptos super regulados associados com a biossíntese de proteínas, sugerindo um

aumento geral na síntese de proteínas no ambiente do plasma, como já descrito anteriormente para células leveduriformes de *P. brasiliensis* tratadas com sangue humano (Bailão *et al.* 2006, 2007 submetido). Assim como na incubação com sangue, a glutamina sintase também é super expressa na condição de incubação com plasma, reforçando a hipótese já descrita anteriormente de que a super expressão desta enzima esteja ligada ao aumento da síntese de quitina que ocorreria durante o estresse osmótico (Bailão *et al.* 2006). Sugere-se que o aumento do transcrito da glutamina sintase durante a incubação com plasma possa estar relacionado com a deposição de quitina em resposta à mudança da osmolaridade externa sofrida pelo *P. brasiliensis* na condição superficial da infecção (incubação com plasma) assim como durante a disseminação sanguínea (incubação com sangue) como já discutido por Bailão *et al.* (2006, 2007).

As análises comparativas dos perfis de genes super regulados durante a incubação com plasma e com sangue demonstraram que aproximadamente 16,6% dos transcritos super regulados encontrados no fungo quando na presença de plasma humano não estavam presentes no sangue, sugerindo a influência das células sanguíneas no perfil transcricional previamente descrito por Bailão *et al.* (2006). Neste sentido, alguns genes são super regulados somente na condição de incubação com plasma (Bailão *et al.* 2007).

Tavares *et al.* (2007) realizaram experimentos nos quais foi possível definir o perfil dos transcritos de *P. brasiliensis*, isolado Pb01, cultivados em macrófagos de murinos. Este fungo possui inúmeros processos adaptativos ao hospedeiro em resposta à fagocitose. Após a internalização, o patógeno promove adaptação metabólica induzindo a expressão de genes da biossíntese de aminoácidos, especificamente genes envolvidos na biossíntese de

metionina. A cistationa β liase de *P. brasiliensis* codificada pelo gene *metG*, associado à produção de metionina, foi induzida após fagocitose de macrófagos de murinos. A importância da cistationa β liase foi relatada em outros modelos animais de infecção; mutantes nos quais o gene *metG* não estava presente, foram menos virulentos que os tipos selvagens (Ejim *et al.* 2004). Neste sentido, a super regulação do gene *metG* pode conferir uma importante resposta adaptativa para sobrevivência de *P. brasiliensis* dentro dos macrófagos onde a concentração de aminoácidos é baixa (Tavares *et al.* 2007). Neste estudo, Tavares *et al.* (2007) observaram a super expressão do gene da *hsp60* em *P. brasiliensis*. A HSP60 é uma chaperona mitocondrial homóloga da GroEL da *E. coli* (Bukau *et al.* 1998) e está envolvida na resposta celular ao estresse oxidativo (Cabisco *et al.* 2002). Tem sido observado que células que apresentam altos níveis de HSP60 são mais resistentes a agentes oxidativos como H_2O_2 e menadiona. A indução do gene da *hsp60* em *P. brasiliensis* exposto a radicais oxidativos produzidos por macrófagos, pode ter função protetora similar (Tavares *et al.* 2007). Adicionalmente, GroEL foi um dos genes mais intensamente super regulados durante infecção experimental de *L. monocytogenes* em macrófagos de murinos (Chatterjee *et al.* 2006), sugerindo uma estratégia conservada em fungos e bactérias para sobrevivência intracelular nas células do hospedeiro (Tavares *et al.* 2007).

A via da biossíntese do enxofre tem sido amplamente estudada em fungos (Marzluf 1997, Thomas & Surdin-Kerjan 1997, Paszewski *et al.* 2000, Paszewski 2001). Como já descrito anteriormente, a fase leveduriforme de *P. brasiliensis* apresenta auxotrofia ao enxofre orgânico (Paris *et al.* 1985). Hwang *et al.* (2003) estudaram a função do enxofre

orgânico na manutenção da fase leveduriforme em *H. capsulatum* refletindo a importância do metabolismo do enxofre no ciclo de vida dos fungos patogênicos. Recentemente, a análise da expressão de genes envolvidos na utilização de enxofre foi realizada em *P. brasiliensis* (Andrade *et al.* 2006, Ferreira *et al.* 2006). Andrade *et al.* (2006) demonstraram em seus experimentos que o enxofre inorgânico é desnecessário durante a diferenciação de micélio para levedura e vice-versa em *P. brasiliensis*. Este estudo também confirmou a super expressão da colina sulfatase (CHS1) na fase leveduriforme de *P. brasiliensis*. O gene que codifica a colina sulfatase está relacionado com a reserva de enxofre para a célula (Marzluf 1997). Interessantemente, outros patógenos intracelulares humanos como o *Mycobacterium tuberculosis* dependem do enxofre para expressão de sua virulência e sobrevivência dentro de macrófagos (Sun *et al.* 2005).

Visando investigar a assimilação de enxofre inorgânico em *P. brasiliensis*, Ferreira *et al.* (2006) inicialmente caracterizaram a expressão de 5 genes envolvidos no metabolismo do enxofre (CDI1-cisteína dioxygenase, MEP1-metionina permease, CHS1-colina sulfatase, APS1-APS kinase, SUR1-sulfito redutase) e avaliaram o acúmulo de RNAm destes genes durante a transição de micélio para levedura e crescimento da fase leveduriforme. CDI1 e MEP1 são genes envolvidos com a via de assimilação orgânica; CHS1 está envolvido com a mobilização e armazenamento de enxofre; APS1 e SUR1 são genes envolvidos com a via de assimilação inorgânica. Todos os cinco genes avaliados neste estudo apresentaram um alto acúmulo de RNAm durante a transição dimórfica e durante o crescimento da fase leveduriforme, sugerindo que nestas situações estão ocorrendo mobilização e armazenamento de enxofre, além da ativação da via de assimilação inorgânica. Os resultados de Ferreira *et al.* (2006) sugerem que embora *P.*

brasiliensis não use enxofre inorgânico como única fonte para iniciar a transição e o crescimento da fase leveduriforme, este fungo pode, de algum modo, utilizar ambas as vias orgânica e inorgânica durante o processo de crescimento. Este estudo fornece novas informações sobre o comportamento transcracional de vários genes envolvidos no metabolismo do enxofre. Entretanto, a transformação e a inativação de sistemas ainda devem ser desenvolvidas em *P. brasiliensis* para definir o envolvimento destes genes na transição dimórfica e/ou virulência (Ferreira *et al.* 2006).

II - JUSTIFICATIVA

A PCM é a micose sistêmica de maior prevalência na América Latina, com o maior número de relatos de casos no Brasil. Atinge predominantemente indivíduos do sexo masculino entre 30 e 60 anos de idade, trabalhadores rurais, residentes em áreas endêmicas. A importância da PCM resulta não somente de sua prevalência relativamente alta, mas também da severidade de suas formas clínicas.

O laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás está inserido em um programa que visa a identificação, caracterização e estudo funcional de moléculas potencialmente associadas à interação do fungo *P. brasiliensis* com o hospedeiro humano. Neste contexto, projetos de sequenciamento de ESTs sob determinadas condições experimentais destacam-se como estratégias interessantes para o entendimento da biologia deste fungo.

O objetivo geral deste estudo foi identificar genes de *P. brasiliensis* induzidos em modelo de infecção experimental, camundongos B10.A, com a finalidade de se identificar alterações na expressão gênica do fungo durante a infecção. O seqüenciamento de ESTs de *P. brasiliensis*, forma leveduriforme, oriundas de fígado de animais experimentais, permitiu descrição de ESTs e a comparação com o banco de ESTs de células leveduriformes do Projeto Genoma Centro Oeste (Felipe *et al.* 2003, 2005). Estes estudos comparativos disponibilizaram informações relevantes para o estudo da virulência e mecanismos envolvidos durante a interação patógeno-hospedeiro. Utilizando-se uma combinação de abordagens experimentais, análises de bioinformática e de ESTs geradas foi

possível obter-se padrões de expressão gênica do fungo na condição de interação patógeno-hospedeiro.

III - OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Obter um banco de ESTs de *P. brasiliensis* - isolado *Pb01* (ATCC, MYA 826) – de fígado de animais experimentais na forma leveduriforme.

Estratégias:

- Extração de RNA total de *P. brasiliensis* após infecção de animais experimentais;
- Construção de uma biblioteca de cDNA a partir do mRNA obtido;
- Seqüenciamento de 9.067 clones de cDNA.

- 2) Categorizar todas as seqüências obtidas através de Anotação via programa Phorest.

Estratégia:

- As seqüências foram comparadas com seqüências depositadas em Bancos de Dados universais para análise de similaridade.

- 3) Identificar genes diferencialmente expressos durante o processo infectivo.

Estratégia:

- Identificação, por análises comparativas, de genes expressos diferencialmente entre as células mantidas *in vitro* (Projeto Genoma Centro-Oeste) e as leveduras obtidas por isolamento de fígado de animais experimentais.

4) Identificar transcritos ainda não descritos em *P. brasiliensis*.

Estratégia:

- Análises comparativas entre os bancos de ESTs gerados neste estudo com bancos de ESTs de levedura proveniente do Projeto Genoma Centro Oeste e banco de dados do NCBI.

5) Selecionar genes de interesse ainda não descritos em *P. brasiliensis* e analisar a sua expressão.

Estratégias:

- Realização de PCR
- Realização de RT-PCR semi-quantitativa.

IV - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albornoz MCB 1971. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia* 9: 248-253.
- Andrade RV, Paes HC, Nicola AM, Carvalho MJ, Fachin AL, Cardoso RS, Silva SS, Fernandes L, Silva SP, Donadi EA, Sakamoto-Hojo ET, Passos GA, Soares CM, Brígido MM, Felipe MS 2006. Cell organization, sulphur metabolism and ion transport-related genes are differentially expressed in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium and yeast cells. *BMC Genomics* 7: 208-221.
- Aristizabal BH, Clemons KV, Cock AM, Restrepo A, Stevens DA 2002. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. *Med Mycol* 40: 169-178.
- Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquati S, Miyaji M, Camargo ZP, Gomes GM, Franco M, Montenegro MR 1998. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasyurus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 58: 505-512.
- Bagagli E, Franco M, Bosco SMG, Hebeler-Barbosa F, Trinca LA, Montenegro MR 2003. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasyurus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol* 41: 217-223.

Bagagli E, Bosco SM, Theodoro RC, Franco M 2006. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Genet Evol* 6: 344-351.

Bailão AM, Schrank A, Borges CL, Dutra V, Molinari-Madlum EEWI, Felipe MSS, Mendes-Giannini MJS, Martins WS, Pereira M, Soares CMA 2006. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: Representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microbes Infect* 8: 2686-2697.

Bailão AM, Shrank A, Dutra V, Felipe MSS, Fiúza RB, Borges CL, Pereira M, Soares C MA 2007. The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. *FEMS Immunol Med Microbiol*, Submitted.

Bammert GF, Fostel JM 2000. Genome-wide expression patterns in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of drug treatments and genetic alterations affecting biosynthesis of ergosterol. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1255-1265.

Barbosa MS, Passos DAC, Felipe MSS, Jesuino RSA, Pereira M, Soares CMA 2004. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is differentially regulated in phases of *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular and phylogenetic analysis. *Fungal Genet Biol* 41: 667-675.

Barbosa MS, Bao SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, dos Santos Feitosa L, Mendes-Giannini MJ, Soares CM 2006. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of

Paracoccidioides brasiliensis is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun* 74: 382-389.

Bartinick-Garcia S, Bartinick DD, Gierz G. 1995. Determinants of fungal cell wall morphology: the vesicle supply center. *Can J Bot* 73: S372-S378.

Bastos KP, Bailão AM, Borges CL, Faria FP, Felipe MSS, Silva MG, Martins WS, Fiúza RB, Pereira M, Soares CMA 2007. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals up regulated and novel genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol*, submitted.

Bialek R, Ibricevic A, Fothergill A, Begerow D 2000. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. *J Clin Microbiol* 38: 3190-3193.

Bukau B, Horwich AL 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92: 351-366.

Cabiscol E, Belli G, Tamarit J, Echave P, Herrero E, Ros J 2002. Mitochondrial Hsp60, resistance to oxidative stress, and the labile iron pool are closely connected in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277:44531-44538.

Carvalho MJ, Jesuíno RSA, Daher BS, Pereira IS, Freitas SM, Soares CMA, Felipe MSS 2003. Functional and genetic characterization of Calmodulin from the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* 39: 204-210.

Chatterjee SS, Hossain H, Otten S, Kuenne C, Kuchmina K, Machata S, Domann E, Chakraborty T, Hain T 2006. Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 74: 1323-1338.

Clemons KV, Feldman D, Stevens DA 1989. Influence of Oestradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Gen Microbiol* 135: 1607-1617.

Corredor GG, Peralta LA, Castano JH, Zuluaga JS, Henao B, Arango M, Tabares, AMR, Matute DR, McEwen JG, Restrepo A 2005. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Med Mycol* 43: 275–280.

Costa AA, Gómez FJ, Pereira M, Felipe MSS, Jesuíno RSA, Jr. Deepe GS, Soares CMA 2002. Characterization of a gene which encodes a mannosyltransferase homolog of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 4: 1027-1034.

Coutinho ZF 1999. *Mortalidade por paracoccidioidomicose no Brasil. 1980/1995* (Estudo descritivo) [Dissertação de Mestrado]. Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B 2002. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saúde Pública* 18: 1441-1454.

Cunha AF, Sousa MV, Silva SP, Jesuino RSA, Soares CMA, Felipe MSS 1999. Identification, N-terminal region sequencing and similarity analysis of differentially expressed proteins in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* 37: 115-121.

Cunha DA, Zancope-Oliveira RM, Felipe MSS, Salem-Izacc SM, Deepe GS Jr, Soares CMA 2002. Heterologous expression, purification and immunological reactivity of a

recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin Diag Lab Immun* 9: 374-377.

Ejim LJ, D'Costa VM, Elowe NH, Loredo-Osti JC, Malo D, Wright GD 2004. Cystathionine beta-lyase is important for virulence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Infect Immun* 72: 3310-3314.

Farias MR, Werner J, Muro M, Marques SA, Marques ME, Franco M, Ribeiro MG, Custodio CC, Condás LAZ, Bosco SMG, Bagagli E 2005. Canine Paracoccidioidomycosis: case report of generalized lymphadenitis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 47: 64.

Felipe MS, Andrade RV, Petrofeza SS, Maranhao AQ, Torres FA, Albuquerque P, Arraes FB, Arruda M, Azevedo MO, Baptista AJ, Bataus LA, Borges CL, Campos EG, Cruz MR, Daher BS, Dantas A, Ferreira MA, Ghil GV, Jesuino RS, Kyaw CM, Leitao L, Martins CR, Moraes LM, Neves EO, Nicola AM, Alves ES, Parente JA, Pereira M, Pocas-Fonseca MJ, Resende R, Ribeiro BM, Saldanha RR, Santos SC, Silva-Pereira I, Silva MA, Silveira E, Simoes IC, Soares RB, Souza DP, De-Souza MT, Andrade EV, Xavier MA, Veiga HP, Venancio EJ, Carvalho MJ, Oliveira AG, Inoue MK, Almeida NF, Walter ME, Soares CM, Brigido MM 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast* 20: 263-271.

Felipe MS, Andrade RV, Arraes FB, Nicola AM, Maranhão AQ, Torres FA, Silva-Pereira I, Pocas-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LM, Andrade PA, Tavares AH, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, Pereira M, Jesuino RS, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS,

Barbosa MS, Martins NF, Fachin AL, Cardoso RS, Passos GA, Almeida NF, Walter ME, Soares CM, Carvalho MJ, Brigido MM, PbGenome Network 2005. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem* 280: 24706-24714.

Ferreira MES, Marques ER, Malavazi I, Torres I, Restrepo A, Nunes LR, Oliveira RC, Goldman MH, Goldman GH 2006. Transcriptome analysis and molecular studies on sulphur metabolism in the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mol Genet Genomics* 276: 450-463.

Franco M 1987. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 25: 5-18.

Garcia NM, Del Negro GM, Heins-Vaccari EM, De Melo NT, De Assis CM, Lacaz CS 1993. *Paracoccidioides brasiliensis* a new sample isolated from feces of a penguin. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 35: 227-235.

Goldman GH, dos Reis Marques E, Duarte Ribeiro DC, de Souza Bernardes LA, Quiapin AC, Vitorelli PM, Savoldi M, Semighini CP, de Oliveira RC, Nunes LR, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Ferreira LE, Moreira JC, Bogossian AP, Tekaia F, Nobrega MP, Nobrega FG, Goldman MH 2003. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryot Cell* 2: 34-48.

- Gómez BL, Nosanchuk JD, Diez S, Youngchim S, Aisen P, Cano LE, Restrepo A, Casadevall A, Hamilton AJ 2001. Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* *in vitro* and during infection. *Infect Immun* 69: 5760-5767.
- Grose E, Tamsitt JR 1965. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibens lituratus*) in Colombia. *Sabouraudia* 4: 124-125.
- Guého E, Leclerc MC, de Hoog GS, Dupont B 1997. Molecular taxonomy and epidemiology of *Blastomyces* and *Histoplasma* species. *Mycoses* 40: 69-81.
- Higgins VJ, Beckhouse AG, Oliver AD, Rogers PJ, Dawes IW 2003. Yeast genome-wide expression analysis identifies a strong ergosterol and oxidative stress response during the initial stages of an industrial lager fermentation. *Appl Environ Microbiol* 69: 4777-4787.
- Hwang L, Hocking-Murray D, Bahrami AK, Andersson M, Rine J, Sil A 2003. Identifying phase-specific genes in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum* by using a genomic shotgun microarray. *Mol Biol Cell* 14 :2314-2326.
- Jesuíno RS, Azevedo MO, Felipe MS, Pereira M, Soares CMA 2002. Characterization of a chaperone ClpB homologue of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast* 19: 963-972.
- Kanetsuna F, Carbonell LM, Moreno RE, Rodriguez J 1969. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 97: 1036-1041.
- Kurokawa CS, Sugizaki MF, Peracoli MT 1998. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 40: 125-135.

Leclerc MC, Phillippe H, Guého E 1994. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J Med Vet Mycol* 32: 331-341.

Londero AT, Ramos CD 1990. Paracoccidioidomicose. Estudo clínico e micológico de 260 casos observados no interior do estado do Rio Grande do Sul. *J Pneumol* 16: 129-132.

Loose DS, Stover EP, Restrepo A, Stevens DA, Feldman D 1983. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 7659-7663.

Maresca B, Kobayashi, GS 2000. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *Contrib Microbiol* 5: 201–216.

Marques ER, Ferreira ME, Drummond RD, Felix JM, Menossi M, Savoldi M, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Carvalho KC, Goldman MH, Goldman GH 2004. Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. *Mol Genet Genomics* 271:667-677.

Marzluf GA 1997. Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. *Annu Rev Microbiol* 51:73–96.

Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT, Restrepo A, Morais F, Nino-Vega G, Taylor JW 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* 23: 65-73.

McEwen JG, Garcia AM, Ortiz BL, Botero S, Restrepo A 1995. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res* 26: 305-306.

Medina H, Bodziak-Júnior C 1949. Contribuição ao ciclo extraparasitário do *Paracoccidioides brasiliensis* II. Cultura do *Paracoccidioides brasiliensis* em terra e influencia exercida pelo pH. *Arg Bio Tecnol* 4: 3-8.

Mendelovici M, Salfelder K, Mendelovici, Romam AR 1974. Intento de aislamiento del *Paracoccidioides brasiliensis* del suelo. *Mycopathol Mycol Appl* 52: 45-53.

Montenegro M.R, Miyaji M, Franco M, Nishimura K, Coelho KI, Horie Y, Mendes RP, Sano A, Fukushima K, Fecchio D 1996. Isolation of fungi from Nature in Region of Botucatu, State of São Paulo, Brazil, an Endemic Area of Paracoccidioidomycosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 665-670.

Moreira SFI, Bailão AM, Barbosa MS, Jesuíno RSA, Felipe MSS, Pereira M, Soares CMA 2004. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis. *Yeast* 21: 173-182.

Negrón P 1966. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo argentino. *Prensa Med Argent* 53: 2831-2832.

Nunes LR, Costa de Oliveira R, Leite DB, da Silva VS, dos Reis Marques E, da Silva Ferreira ME, Ribeiro DC, de Souza Bernardes LA, Goldman MH, Puccia R, Travassos LR, Batista WL, Nobrega MP, Nobrega FG, Yang DY, de Braganca Pereira CA, Goldman GH 2005. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot Cell* 4: 2115-2128.

- Paris S, Duran-Gonzalez S, Mariat F 1985. Nutritional studies on *Paracoccidioides brasiliensis*: the role of organic sulfur in dimorphism. *Sabouraudia* 23: 85-92.
- Paris S, Prevost MC, Latge JP, Garrison RG 1986. Cytochemical study of the yeast and mycelial cell walls of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exp Mycol* 10: 228-242.
- Paszewski A, NatorV R, Piotrowska M, Brzywcz J, Sienko M, Grynberg M, Pizzinini E, Turner G 2000. Regulation of sulfur amino acid biosynthesis in *Aspergillus nidulans*: physiological and genetical aspects. In: C Brunold (ed) *Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants*. Paul Haupt, Switzerland, p. 93–105.
- Paszewski A 2001. Sulphur metabolism in fungi: pathways and regulation. *Recent Res Devel Microbiol* 5: 223-234.
- Popolo L, Gilardelli D, Bonfante P, Vai M 1997. Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the ggp1delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 179: 463-469.
- Restrepo A, Moncada HL, Quintero M 1969. Effect of hydrogen ion concentration and of temperature on the growth of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil extracts. *Sabouraudia* 7: 207-215.
- Restrepo A 1970. A reappraisal of the microscopic appearance of the mycelial phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia* 8: 141-44.
- Restrepo-Moreno A, Greer DL 1983. Paracoccidioidomycosis. In: AF Di-Salvo, *Occupational Mycoses*, Philadelphia: Lea & Febiger. p. 43-64.

Restrepo A 1985. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved.

Sabouraudia 23: 323-334.

Restrepo A, McEwen JG, Castaneda E 2001. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*:

how far from solving the riddle? *Med Mycol* 39: 233-241.

Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M 2004. Canine

paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 42: 379-383.

Salem-Izacc SM, Jesuino RSA, Brito WA, Pereira M, Felipe MSS, Soares CMA 1997.

Protein synthesis patterns of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in stage-specific forms and during cellular differentiation. *J Med Vet Mycol* 35: 205-211.

Salem-Izacc SM, Gomez FJ, Jesuino RS, Fonseca CA, Felipe MS, Deepe GS, Soares CM

2001. Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* 39: 445-455.

San-Blas G 1982. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-

parasite relationships. *Mycopathologia* 79: 159-184.

San-Blas G 1985. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall glucans, pathogenicity, and

dimorphism. *Curr Top Med Mycol* 1: 235-257.

San-Blas G, San-Blas F, Rodriguez LE, Castro CJ 1987. A model of dimorphism in

pathogenic fungi: *Paracoccidioides brasiliensis*. *Acta Cient Venez* 38: 202-211.

San-Blas G 1993. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides*

brasiliensis. *J Med Vet Mycol Rev* 31: 99-113.

San-Blas G, San-Blas F 1993. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism

In: M Franco *et al.*, *Paracoccidioidomycosis*, CRC Press, p. 49-66.

San-Blas G, Nino-Vega G 2001. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In RL Cihlar, RA Calderone, *Fungal pathogenesis: principles and clinical applications*, 1st ed., New York: Marcel Dekker, p. 205-226.

San-Blas G, Nino-Vega G, Iturriaga T 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* 40: 225-242.

Sano A, Nishimura K, Miyaji M 1999. The research encouragement award. Effects of sex hormone on sexual difference of experimental paracoccidioidomycosis. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 40: 1-8.

Silva SP, Felipe MSS, Pereira M, Azevedo MO, Soares CMA 1994. Phase transition and stage-specific protein synthesis in the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exp Mycol* 18: 294-299.

Silva SP, Borges-Walmsley MI, Pereira IS, Soares CMA, Walmsley AR, Felipe MSS 1999. Differential expression of an hsp70 gene during transition form the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mol Microbiol* 31: 1039-1050.

Sun M, Andreassi JL, Liu S, Pinto R, Triccas JA, Leyh TS 2005. The tri-functional sulfate-activating complex (SAC) of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 280: 7861-7866.

Tavares AHFP, Silva SS, Dantas AC, Campos EG, Andrade RV, Maranhão AP, Brígido MM, Passos-Silva DG, Fachin AL, Teixeira SMR, Passos GAS, Soares CMA, Bocca AL, Carvalho MJA, Silva-Pereira I, Felipe MSS 2007. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbes Infect* 9: 583-590

Thomas D, Surdin-Kerjan Y 1997. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 503-532.

Villar LA, Tobon A, Restrepo A, Calle D, Rosero DS, Gomez BL, Restrepo A 2000. Central nervous system paracoccidioidomycosis. Report of a case successfully treated with itraconazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 42: 231-234.

Walton FJ, Idnurm A, Heitman J 2005. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 57: 1381-1396.

V – MANUSCRITO

Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction

*Manuscrito aceito para publicação na Microbiology.

Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells recovered from infected mice bring new insight into fungal response upon host-interaction.

Running Title: Transcriptome of *P. brasiliensis* during infection

Genes and Genomes

Milce Costa^{1a}; Clayton L. Borges^{1a}; Alexandre M. Bailão¹; Gabriela V. Meirelles¹; Yuri A. Mendonça¹; Sabrina F. I. M. Dantas¹; Fabrícia P. de Faria¹; Maria S. S. Felipe²; Eugênia E. W. I. Molinari-Madlum³; Maria J. S. Mendes-Giannini⁴; Rogério B. Fiuzal¹; Wellington S. Martins⁵; Maristela Pereira¹ and Célia M. A. Soares^{1*}.

1-Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brazil.

2-Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília.

3-Laboratório de Immunopatologia, Universidade Federal de Goiás.

4-Laboratório de Micologia, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo.

5-Laboratório de Bioinformática, Universidade Católica de Goiás, Goiânia.

a -These authors contributed equally to this work

*- Corresponding author: Célia Maria de Almeida Soares, Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, ICBII, Campus II, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brazil. Phone/fax: 55-62-35211110. e-mail: celia@icb.ufg.br

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, infection, transcriptome, pathogenesis.

Summary

Paracoccidioides brasiliensis is a fungal human pathogen with a wide distribution in Latin America, causing paracoccidioidomycosis, the most widespread systemic mycosis in Latin America. Although gene expression in *P. brasiliensis* had been studied, little is known about the genome sequences expressed by *P. brasiliensis* in the infectious process. To better understand the infectious process, 4934 expressed sequence tags (ESTs) derived from a non-normalized cDNA library from *P. brasiliensis* (isolate Pb01) yeast cells recovered from liver of infected mice were annotated and clustered to a unigene set with 1602 members. A large-scale comparative analysis was performed between unigene sequences of *P. brasiliensis* yeast cells recovered from infected mice and the database constructed with fungal sequences of the yeast and mycelium transcriptome (isolate Pb01) at (<https://dna.biomol.unb.br/Pb/>), as well as with all public ESTs available at GenBank, including fungal sequences of the *P. brasiliensis* yeast transcriptome (isolate Pb18) at (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The focus has been on the over expressed and novel genes. From the total, 3184 ESTs (64.53 %) were also present in the previously described transcriptome of yeast and mycelium cells obtained from *in vitro* cultures (<https://dna.biomol.unb.br/Pb/>) and from those, 1172 ESTs (23.75 % of the described sequences) represented over regulated transcripts during the infective process. Comparative analysis produced 1750 ESTs (35.47 % of the total), comprehending 649 unigene sequences representing novel transcripts of *P. brasiliensis*, not previously described for this isolate or for other isolates in public databases. KEGG pathway mapping showed that novel and over expressed transcripts represented standard metabolic pathways, including glycolysis, amino acid biosynthesis, lipid and sterol metabolism. The unique and divergent representation of transcripts in the cDNA library of yeast cells recovered from infected mice suggests differential gene expression in response to the host milieu.

Introduction

The dimorphic pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, the etiologic agent of paracoccidioidomycosis (PCM), undergoes a complex transformation; the fungus switch from the mycelial infective form growing at environmental temperatures to the yeast form occurring at the mammalian host-temperature. The fungus is a pathogen that infects around 10 million individuals in endemic regions distributed from Mexico to Argentina (Restrepo *et al.*, 2001). During infection, the host inhales mycelia spores that converts to the budding yeast form within hours. The disease is characterized by a chronic granulomatous inflammation, and patients may present a broad spectrum of clinical manifestations (Montenegro & Franco, 1994).

Analysis of the response of *P. brasiliensis* during infection provides a window into the alterations required for the organism to survive in the host milieu. Transcriptional profiles of fungal cells, as well as the relative expression of transcripts in each *P. brasiliensis* phase had been exploited (Felipe *et al.*, 2003; Goldman *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2004; Felipe *et al.*, 2005). Also transcriptional responses to temperature mimicking the events of differentiation upon fungal inhalation by the host have been studied (Nunes *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2007). Regarding to the isolate Pb01, subject of the present work, *in silico* electronic subtraction and cDNA microarrays provided a view of the fungal metabolism, demonstrating up regulated transcripts and differential expression patterns in yeast and mycelium (Felipe *et al.*, 2005).

We have been studying differentially expressed genes in *P. brasiliensis* yeast cells upon exposure to host-like conditions. We previously investigated, by cDNA-representational difference analysis (cDNA-RDA), the genes over expressed by *P. brasiliensis* upon infection in a mouse model of infection, as well as upon incubation of yeast cells with human blood (Bailão *et al.*, 2006). Genes putatively related to fungal transport, cell defense and cell wall synthesis/ remodeling were especially up regulated in the analyzed host-like conditions. In this work we sought to amplify our studies of genes potentially related to the fungal host interaction by analyzing the transcriptome of yeast cells recovered from liver of infected mice. We analyzed 4934 ESTs generated from a cDNA library. Novel genes as well as up regulated genes compared to the *in vitro* transcriptome

(<https://dna.biomol.unb.br/Pb/>) and to the Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ESTs provided insights into metabolic adaptations performed by *P. brasiliensis* during infection. The yeast cells significantly over express genes related to the glycolysis and ethanol production, to the fatty acid synthesis, and to the metabolism of nitrogen, suggesting a nutrient-rich microenvironment. Also, the over production of transcripts of genes represented by these pathways indicates metabolically active fungal cells that can utilize carbohydrate, lipid and nitrogen sources to generate the necessary compounds and energy for carrying on cellular processes or responding to the surrounding microenvironment.

Methods

Maintenance of *P. brasiliensis* and animal infection. *P. brasiliensis* (ATCC MYA-826) was grown for seven days in BBL Mycosel Agar (Becton-Dickinson), supplemented with 10 % fetal calf serum, at 36 °C for the yeast phase (control cells). Mice infection was performed as previously described (Bailão *et al.*, 2006). *P. brasiliensis* yeast cells were harvested from 7-day-old cultures, suspended in sterile phosphate buffered saline solution (PBS, pH 7.4). Male B.10A mice, 8-12 weeks old were infected intraperitoneally with 5 x 10⁶ yeast cells. Animals were sacrificed at seven days after infection; livers were removed and homogenized in 5 mL of sterile PBS. The cellular suspensions were washed three times, centrifuged at 1000 x g and resuspended in 1 mL of PBS. Aliquots (100 mL) of the suspension were plated onto BBL Mycosel Agar, supplemented with 10 % fetal calf serum. After 14 days incubation, the yeast cells were recovered and used to extract total RNA. Procedures involving animals and their care were conducted in conformity to the local Ethics Committee and international recommendations. Control yeast cells and that recovered from infected tissue were used for RNA extractions.

RNA extractions. Total RNA was extracted from all experimental conditions by the use of Trizol reagent (InvitrogenTM, Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. RNAs were used to construct double-stranded cDNAs.

Construction of the cDNA library. The *P. brasiliensis* cDNA library was constructed following the protocols of the SUPERSCRIPT Plasmid System with GATEWAY Technology for cDNA synthesis and Cloning (InvitrogenTM Life Technologies).

DNA sequencing. The cDNA library was plated to approximately 200 colonies per plate (150 mm Petri dish). The colonies were randomly selected and transferred to a 96-well polypropylene plate containing LB medium and grown overnight. Plasmid DNA was isolated and purified. cDNA inserts were sequenced from the 5' end by employing standard fluorescence labeling DYEnamicTM ET dye terminator kit with the M13/pUC flanking vector primer. Automated sequence analysis was performed in a MegaBACE 1000 DNA sequencer (GE Healthcare, Amersham Biosciences).

EST Processing Pipeline, Annotation and Differential Expression Analysis. EST sequences were pre-processed using the Phred (Ewing & Green, 1998) and Crossmatch (<http://www.genome.washington.edu/UWGC/analysis/tools/Swat.cfm>) programs. Only sequences with at least 100 nucleotides and Phred quality greater or equal to 20 were considered for further analysis. ESTs were screened for vector sequences against the UniVec data. The resulting sequences were uploaded to a relational database (MySQL) on a Linux (Fedora) platform, and processed using a modified version of the PHOREST tool (Ahren *et al.*, 2004). The filtered sequences were compared against the GenBank non-redundant (nr) database from National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/GO>) besides InterPro's databases of protein families (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>). MIPS (<http://mips.gsf.de/>) database was used to assign functional categories and KEGG (<http://www.kegg.com/>) was used to assign Enzyme Commission (EC) numbers and metabolic pathways. The database sequences matches were considered significant to e values $\leq 10^{-5}$. The clusters were compared to *P. brasiliensis* transcriptome database (<https://dna.biomol.unb.br/Pb/>), to select novel and over expressed genes. Also, for the description of novel genes, sequences were compared to sequences in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) that also comprehended the ESTs reported by Goldman *et*

al (2003) available in NCBI database. BLASTX analysis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul *et al.*, 1997) was used to find matching sequences with e values $\leq 10^{-5}$. With CAP3 assembly (Huang & Madan, 1999) information stored in the relational database, SQL queries were performed to determine transcripts unique to a certain EST library and/or present in two or more libraries. We have constructed a database to host all the sequence data and the analysis results obtained from this study. The database can be accessed through a web interface at (<http://www.lbm.icb.ufg.br/phorestwww/index.php>). All the ESTs were submitted to GenBank under accession numbers EST1487 to EST6420.

In silico determination of up regulated genes. To assign a differential expression character, the contigs formed with mycelium, yeast and the yeast cells recovered from infected mice ESTs were statistically evaluated using the Audic and Claverie's method (Audic & Claverie, 1997). Over regulated genes, compared to the *P. brasiliensis* transcriptome database (<https://dna.biomol.unb.br/Pb/>), were determined with a 95 % confidence rate.

Infection of Vero cells with *P. brasiliensis*. Cultures of Vero cells (ATCC CCL81) were maintained in Medium 199 (Sigma, Aldrich) supplemented with 10 % (v/v) heat-inactivated fetal calf serum. The cells were washed three times in 199 medium and 108 yeast cells of *P. brasiliensis* were added and incubated for 48 h at 36 °C, as described (Mendes-Giannini *et al.*, 2006). The cells were washed three times in PBS following the incubation in PBS containing trypsin (0.2 %) and EDTA (0.02 %) for 30 min for the total monolayer removal. The cells were centrifuged and the pellet was recovered for further RNA extraction.

PCR analysis of genomic DNA of *P. brasiliensis*. The presence of novel genes was initially assayed by PCR of genomic DNA of *P. brasiliensis* yeast cells, prepared according standard methods. PCR of selected genes was performed with specific primers, sense and antisense, as described in Table 1.

Semi quantitative RT-PCR analysis of *P. brasiliensis* regulated genes. Total RNAs were obtained from control yeast cells, from a different batch of infected animals, of those used for the construction of the cDNA library and from fungal yeast forms infecting Vero cells. Single stranded cDNAs were synthesized. PCRs were performed using cDNAs as template in a 30 mL reaction mixture containing specific primers (Table 1). PCR conditions were: 95 °C for 1 min, 95 °C for 30 s, annealing at 55-65 °C for 2 min, 25-35 cycles at 72 °C for 1 min, final extension at 72 °C for 7 min. The annealing temperature and the number of PCR cycles were optimized for each experimental condition to ensure logarithmic phase of amplification in semi quantitative RT-PCR (sqRT-PCR) analysis. Amplicons were analyzed by agarose gels electrophoresis (1 %). The analyses of relative differences were performed using Scion Image Beta 4.03 software (http://www.scioncorp.com/pages/scion_image_windows.htm).

Results

Overview of ESTs from *P. brasiliensis* yeast cells recovered from infected mice
The purpose of this study was to identify a set of up regulated genes, as well as novel genes expressed by *P. brasiliensis* in a mouse model of infection, as a first step for the large screen for genes associated with the fungal pathogenesis. A total of 4934 high quality sequences were obtained and used to establish an EST database comprised of 1602 unique sequences from *P. brasiliensis* yeast cells recovered from liver of infected mice (<http://www.lbm.icb.ufg.br/phorestwww/index.php>). A total of 1172 sequences (23.75 % of the total) corresponded to over expressed sequences when compared to the transcriptome of *P. brasiliensis* yeast cells *in vitro* cultivated. A total of 1750 sequences (35.47 % of the total) had no homology to sequences found in *P. brasiliensis* previously, as demonstrated by comparative analysis to the ESTs from the described *P. brasiliensis* transcriptomes (Felipe *et al.*, 2005; Goldman *et al* 2003). All sequences were arranged into 1041 contigs and 561 singletons that represent different transcripts.

Functional annotation and analysis of sequences

The EST sequences were compared to the non-redundant database from NCBI using BLASTX algorithm (Altschul *et al.*, 1997). ESTs and unigenes were given a putative assignment according to the classification developed by MIPS (Fig. 1). The major MIPS categories included those outlining metabolism, cellular transport, energy, cell cycle and DNA processing, cell rescue and virulence, protein synthesis, protein fate. A high proportion (41.12 %) exhibited sequence similarity only to genes of unknown function or encoding hypothetical proteins, which may reflect the specialization of these structures in *P. brasiliensis*.

Identification of over expressed genes identified by in silico EST subtraction and of novel transcripts in the yeast cells recovered from infected mice.

To select up regulated transcripts during the infectious process of *P. brasiliensis*, isolate Pb01, we performed comparative analysis of the generated ESTs to the transcriptome database generated with *in vitro* grown mycelium and yeast fungal cells (Felipe *et al.*, 2005). The distribution of the over expressed ESTs, representing 1172 sequences are presented in Table 1, supplementary material. Analysis of the MIPS categories showed a significant statistical difference between the *in vitro* cultured cells and the infectious library for several biological processes. The results indicated that the over induced genes obtained by comparative analysis encoded enzymes from several metabolic pathways, transcription factors, membrane transporters, among others. The data illustrates the functional diversity of those over expressed ESTs, denoting particular functional categories dominating the analysis.

To select novel transcripts during the infectious process of *P. brasiliensis* we performed comparative analysis of the generated ESTs (<http://www.lbm.icb.ufg.br/phorestwww/index.php>) to the transcriptome database at the (<https://dna.biomol.unb.br/Pb/>) and to the ESTs and complete sequences present at GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The distribution of the novel ESTs, representing 1750 sequences is presented in Table 2, supplementary material. The ESTs were classified into 16 groups of functionally related genes, with sequences encoding enzymes of cell

metabolism and energy, transport facilitators and transcription factors dominating the analysis.

Highly redundant genes

Table 2 lists the 50 most abundant ORFs in the EST collection in the present transcriptome. A total of 50 contigs containing 892 ESTs were highly redundant. This accounted for 18.08 % of the total high quality ESTs. The minimum number of ESTs that made up these most highly redundant contigs was 10. A great number of ESTs encoded for membrane transporters, stress-related proteins, molecules related to nitrogen metabolism, enzymes of carbohydrate and lipid metabolism. Most of the abundant transcripts represent over expressed genes. Included in the high abundant category of transcripts there are some previously described as yeast up regulated genes when compared to mycelia, such as those encoding alcohol dehydrogenase, aromatic-L-amino acid decarboxylase and isocytrate lyase (Felipe *et al.*, 2005). The presence of *P. brasiliensis* novel genes was noted in the high abundant category, such as those encoding for carbonic anhydrase and glucokinase.

Overview of *P. brasiliensis* infective transcriptome: Pathway analysis based on the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) classification

EC numbers were used to judge, which sequences pertained to a specific pathway. 320 unique sequences including 265 contigs and 55 singlets accounted for 19.97 % of unique sequences and matched enzymes with an EC number. The distribution of novel and up regulated ESTs was followed, as demonstrated in Table 3. Based on the KEGG classification, it was observed that novel and over regulated transcripts were predominantly involved in carbohydrate, amino acids, energy and lipid metabolism.

Most relevant aspects of metabolic routes over regulated in the infectious process

Analyzing the data presented in Tables 1 and 2, supplementary material, some insights were provided in the metabolic features of *P. brasiliensis* yeast cells during the infective pathway. Metabolic features are summarized in Table 4. Among the processes that appear

to be increased in yeast cells in the infectious process, carbohydrate, lipid and nitrogen metabolism showed the most significant changes.

Metabolism of carbohydrates

Homologues of 9 genes related to carbohydrate synthesis/degradation were identified as novel or over expressed in the unigene set (Table 4). Transcripts encoding acylphosphatase, quinoprotein alcohol dehydrogenase, glucokinase and phosphoglycerate mutase, potentially related to the anaerobic metabolism of glucose, were here described. Glycogen phosphorylase I could be required for the mobilization of glycogen providing glucose for energy production. D-ribose 5- phosphate ketol isomerase would allow oxidative reactions to continue by the production of hexose phosphates. Also systems for the transport of sugars, such as, MFS1, MFS2, and PTS, are over expressed putatively providing additional fuel for the oxidative reactions.

Lipid metabolism

Genes involved in the lipid metabolism were over induced or represented novel transcripts of *P. brasiliensis*, as summarized in Table 4. The over expressed malic enzyme is required in the transport of acetyl groups to the cytosol and provides NADPH for lipid synthesis. Carbonic anhydrase could provide bicarbonate for the synthesis of malonyl-CoA by acetyl-CoA carboxylase, over induced in the infectious process and a key regulatory enzyme in the fatty acid metabolism. Also fatty acyl CoA synthase is over expressed in the present transcriptome, reinforcing the suggestion of an active synthesis of lipids by yeast cells during infection.

The synthesis /remodeling of membrane components, including ergosterol, can be induced. Transcripts encoding MBOAT, a putative acetyltransferase involved in phospholipid biosynthesis/remodeling, a patatin-like protein with putative phospholipase A2 activity and a phospholipase A1 are over expressed in the infection condition. Delta-9 fatty acid desaturase (Ole1), a novel gene, could introduce double bond into saturated fatty acyl CoA substrates giving rise to monounsaturated fatty acids. The transcript encoding for sterol C-methyltransferase, ERG6, related to the biosynthesis of ergosterol is up regulated; it was

also detected the novel transcript encoding a homologue of squalene synthase, ERG 9, catalyzing the first committed step in the sterol biosynthesis pathway. The synthesis of sphingolipids could be increased by over expression of the delta-8-sphingolipid desaturase.

TCA and the glyoxylate cycle and energy production

The glyoxylate cycle could be induced in yeast cells in the infectious process. The isocitrate lyase gene is up regulated. Genes with functions associated with the glyoxylate cycle were also induced, such as the one encoding hydroxymethyl glutaryl-CoA lyase, which could provide acetyl CoA. The transport of acetyl-CoA into the mitochondria can be over regulated. Carnitine acetyltransferase and carnitine acylcarnitine translocase, are required for the transport of acetyl CoA from the peroxisomes into the mitochondria. Components of the classical pathway of oxidative phosphorylation are present.

Nitrogen metabolism

Comparison of our EST data to KEGG revealed that many over expressed transcripts encode proteins that are probably involved in amino acid pathways (Table 4). Glutamine synthetase catalyzes the ATP-dependent conversion of glutamate and ammonium to glutamine. In this sense, urease in yeast cells could lead to the over production of ammonia arising from urea. Analysis of the amino acid metabolism pathways indicated that *P. brasiliensis* during the infectious process could itself synthesize asparagine. Imidazole glycerol phosphate synthase catalyses the closure of the imidazole rings within histidine biosynthesis; the enzyme links amino acid and nucleotide biosynthesis providing the substrate for de novo purine biosynthesis. 3-isopropylmalate dehydrogenase catalyzes the last step in the biosynthesis. The first and a key enzyme in the lysine biosynthesis pathway, homocitrate synthase is also up regulated. Also the lysine uptake should be increased by the over expression of a lysine specific permease. Cysteine synthase B could promote thiosulfate assimilation and cysteine could be over produced by the action of the up regulated transcript encoding cystathionine b-synthase. The over expression of the high affinity methionine permease, could promote uptake of methionine and cysteine. Aci-reductone dioxygenase could promote the methionine salvage pathway (MTA).

Adenylsuccinate lyase, which encodes an enzyme involved in adenylate synthesis and orotate phosphorybosyltransferase involved in pyrimidine biosynthesis are, respectively, over expressed and novel genes here described.

Validation of the ESTs by PCR analysis and expression of selected genes in yeast cells recovered from infected mice and in an ex vivo model

We initially validated 5 novel genes by PCR analysis of genomic *P. brasiliensis* DNA, as shown in Figure 2A. The novel genes encoding indigoidine synthase A-like protein (indA), oligopeptide transporter protein (opt), Rho guanyl exchange factor (gef), oxidation resistance protein (oxr1) and glucokinase (glk) were demonstrated to be present in the genome of *P. brasiliensis*. In the next series of experiments, confirmatory data about the expression level from EST redundancy analysis was provided by sqRT-PCR analysis. Transcripts encoding carbonic anhydrase (ca), myosin 2 isoform (myo2), telomerase reverse transcriptase (tert), poly (A) polymerase (pap1), orotate phosphoribosyltransferase (ura5) and patatin-like serine hydrolase (pat) were confirmed as present in higher amounts in yeast cells recovered from infected mice liver (Fig. 2B). Also, some novel transcripts were validated by sqRT-PCR of RNAs obtained from yeast forms interacting with *in vitro* cultured Vero cells. The novel transcripts encoding ca, myo2, tert, pap1, pat, squalene synthetase (erg9), oxr1 and glk were present in yeast cells in the ex vivo model (Fig. 3).

Discussion

Here, we report in silico analysis and comparison of ESTs from yeast cells of *P. brasiliensis* recovered from infected liver with previously described *P. brasiliensis* transcriptomes. The expression profiles of genes encoding enzymes involved in primary metabolism show that there is a striking degree of coordinate regulation of some of the genes in the same pathway. In one example, genes encoding enzymes, regulators and transporters in carbohydrate metabolism are significantly over expressed in fungal cells recovered from infected tissue. In another example, transcripts for the lipid synthesis are expressed at high levels.

A great number of induced and novel genes in yeast cells after recovery from liver were committed to carbohydrate metabolism. In previous studies, comparing the mRNA expression of mycelia and yeast cells, Felipe *et al.* (2005) suggested that the metabolism of yeast cells is more anaerobic than that of mycelium toward the production of ethanol. Our data suggest that *P. brasiliensis* yeast cells infecting mouse liver exacerbates its anaerobic behavior, when compared to the *in vitro* cultured yeast cells. Actually there is an increase in mRNA expression of several genes of the glycolysis. Corroborating our data, a glucokinase gene of *S. cerevisiae* is over expressed under conditions of ethanol induction (Herrero *et al.*, 1999). Although the physiological role of acylphosphatase, is as yet unknown, the enzyme plays a part in the regulation in the glycolytic pathway, by increasing the rate of glucose fermentation in yeast (Raugei *et al.*, 1996). The predicted up regulation of glycolysis in *P. brasiliensis*, here described, is corroborated by the description of predominance of glycolytic metabolism in *Candida albicans* colonizing mouse tissues (Barelle *et al.*, 2006). Additionally, the emphasis on the over expression of those enzymes of the carbohydrate metabolism suggests that the milieu may provide a sufficient nutritional environment enabling the predominance of the glycolytic pathway toward the production of ethanol, a metabolic pathway that should be particularly important during liver infection because of abundant glucose in this host milieu.

Ethanol could be a relevant carbon source by entering the glyoxylate cycle, that has been previously described as up regulated in the fungal yeast cells (Felipe *et al.*, 2005). The cycle can be more active in yeast cells infecting mouse liver, as demonstrated here by the over expression of the regulatory enzyme isocitrate lyase, suggesting that some nonfermentable compounds are important for energy production during infection as described for fungi, such as *C. albicans* and *Cryptococcus neoformans* (Lorenz & Fink, 2001; Ramírez & Lorenz, 2007; Rude *et al.*, 2002). Interestingly, the isocitrate lyase gene of *Penicillium marneffei* is strongly induced at 37 °C, even in the presence of a repressing carbon source, such as glucose (Cánovas & Andrianopoulos, 2006), a condition occurring in liver.

The biosynthesis of lipids can be up regulated in the infectious process. The over expression of transcripts encoding lipogenic enzymes corroborates this suggestion. Fatty

acid synthesis is maximal when carbohydrate and energy are plentiful, a condition supposed to occur in liver. Regarding to carbonic anhydrase, studies had demonstrated that the enzyme activity is required for *C. neoformans* fatty acid biosynthesis (Bahn *et al.*, 2005). It has not escaped our attention that carbonic anhydrase mRNA increase may reflect the high CO₂ levels in the host tissue.

Membrane composition seems to change during infection. Ergosterol is the major sterol from fungal membrane and affects fluidity and permeability of this structure. Transcripts encoding ERG6 and ERG9 were differentially regulated. Also were increased the mRNA levels for enzymes related to the synthesis and remodeling of the cell membrane, such as OLE1, involved in regulating membrane fluidity in animal cells and microorganisms (Gargano *et al.*, 1995), and responsible for the adjustments in the membrane composition in response to nutritional change (Vigh *et al.*, 1988).

P. brasiliensis seems to perform oxidative phosphorylation by classical pathways during infection. Of special note is the huge over expression of the ATP synthase F0F1 subunit 9, whose relevance is not clear.

Nitrogen metabolism is one aspect of basic metabolism, which is still quite unknown in the field of pathogenesis. The most critical genes for *S. cerevisiae* *in vivo* survival were those required for amino acid biosynthesis (Kingsbury *et al.*, 2006). We described here 14 novel/over expressed genes related to the metabolism of amino acids, suggesting that this aspect of metabolism should be very relevant to the fungal survival in the host liver environment. Among the genes were those encoding several metabolic steps in biosynthesis of amino acids, as well as the transcriptional regulator NMRA gene encoding for a predictable nitrogen metabolite repressor, suggesting that *P. brasiliensis* is subjected to nitrogen metabolite repression under host conditions, probably reflecting the ammonia and glutamine availability in liver.

It can be suggested by the transcriptional data provided by this study that glutamine, asparagine, histidine, lysine, cysteine and methionine increased biosynthesis were important for the survival of *P. brasiliensis* during infection. Glutamine formation plays a key role in nitrogen metabolism, assuring the reassimilation of nitrogen released from cellular processes and providing the source of amino groups in a wide range of biosynthetic

processes. Our analysis indicated that during infection *P. brasiliensis* seems to be able of itself synthesize asparagine, providing, in addition to glutamine, another source for transient storage of nitrogen. The novel transcript encoding aci-reductone dioxygenase suggests the presence of the methionine salvage pathway cycle (Hirano *et al.*, 2005) providing additional methionine, which could be scarce in the host environment. Overall, the presumable increase in synthesis of those cited amino acids implies that those compounds are not present at sufficient levels in tissue to support growth of *P. brasiliensis*. To obtain further corroboration of the validity of our EST results, we performed RT-PCR analysis of some selected transcripts in yeast cells recovered from infected tissue in another series of experiments from those used to construct the cDNA library, as well as in an ex vivo model of infection. Several novel transcripts, such as those encoding glucokinase and carbonic anhydrase were confirmed, further corroborating the validity of our EST analysis and suggesting the relevance of those transcripts in the infectious process.

Importantly, several of the genes identified in this work had previously been implicated in the pathogenesis in other organisms. The most important types of melanin in fungi are DHN-melanin and DOPA-melanin that have been implicated in pathogenesis (Hamilton & Gomez, 2002). Transcripts encoding aromatic L-amino acid decarboxylase were abundant in yeast cells in our experimental conditions, reinforcing the relevance of DOPA-melanin in infection, as suggested (Gomez *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2006; Bailão *et al.*, 2006). Polyketide synthase is a novel transcript, suggesting that *P. brasiliensis* could synthesize melanin via the polyketide synthase pathway, as described in some fungi (Paolo Jr *et al.*, 2006). *C. albicans* carbonic anhydrase mutants cannot induce true hyphae in response to high CO₂, a condition of induction of filamentation (Klengel *et al.*, 2005). Tissue damage and dissemination by *Coccidioides* involve the ammonia-based alkalinization of the host environment through the activity of fungal urease (Mirbod-Donovan *et al.*, 2006). The oxidation resistance (OXR1) protein is involved in cells protection from oxidative hydrogen peroxide damage in organisms (Elliott & Volkert, 2004). The gene encoding orotate-5-monophosphate pyrophosphorylase in *Histoplasma capsulatum* is essential for fungal virulence in a mouse infection model (Retallack *et al.*, 1999). Those findings further encourage the study of the relevance of those genes for *P. brasiliensis* pathogenesis.

In synthesis our data suggest that likely *P. brasiliensis* uses multiple carbon sources during liver infection, including glucose and substrates of the glyoxylate cycle. In addition, the metabolism of nitrogen can be very active during the infectious process, suggesting that while some nitrogenous compounds can be preferentially acquired from the host, others must be supplemented by the pathogen. Also, the biosynthesis of lipids can be very active suggesting the plentiful of carbohydrates and energy.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CNPq. The authors thank LNCC for the bioinformatics support.

References

- Ahren, D., Troein, C., Johansson, T. & Tunlid, A. (2004).** Phorest: a web-based tool for comparative analyses of expressed sequence tag data. Mol Ecol Notes **4**, 311-314.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res **25**, 3389-3402.
- Audic, S. & Claverie, J. M. (1997).** The significance of digital gene expression profiles. Genome Res **7**, 986-995.
- Bahn, Y.S., Cox, G.M., Perfect, J.R. & Heitman, J. (2006).** Carbonic anhydrase and CO₂ sensing during *Cryptococcus neoformans* growth, differentiation, and virulence. Current Biol **15**, 2013-2020.
- Bailão, A. M, Schrank, A., Borges, C. L., Dutra, V., Molinari-Madlum, E. E. W. I., Felipe, M. S. S., Mendes-Giannini, M. J. S., Martins, W. S., Pereira, M. & Soares, C. M. A. (2006).** Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host

interaction conditions: Representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microbes Infect* **8**, 2686-2697.

Bailão, A. M., Shranks, A., Dutra, V., Felipe, M. S. S., Fiúza, R. B., Borges, C. L., Pereira, M., & Soares, C. M. A. (2007). The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. *FEMS Immunol Med Microbiol* (In press).

Barelle, C. J., Priest, C. L., MacCallum, D. M., Gow, N. A. R., Odds, F. C. & Brown, A. J. P. (2006). Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. *Cell Microbiol* **8**, 961-971.

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. (2007). The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol* **7**, 29.

Cánovas D. & Andrianopoulos, A. (2006). Developmental regulation of the glyoxylate cycle in the human pathogen *Penicillium marneffei*. *Mol Micobiol* **62**, 1725-1738.

Elliott, N. A. & Volkert, M. R. (2004). Stress induction and mitochondrial localization of Oxr1 proteins in yeast and humans. *Mol Cell Biol* **24**, 3180-3187.

Ewing, B. & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* **8**, 186-194.

Felipe, M. S. S., Andrade, R. V., Arraes, F. B. M., Nicola, A. M., Maranhão, A. Q., Torres, F. A. G., Silva-Pereira I., Poças-Fonseca, M. J., Campos, E. G. & other authors (2005). Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem* **280**, 24706-24714.

Felipe, M. S. S., Andrade, R. V., Petrofeza, S. S., Maranhao, A. Q., Torres, F. A., Albuquerque, P., Arraes, F. B., Arruda, M., Azevedo, M. O. & other authors (2003). Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast* **20**, 263-271.

Gargano, S., Di Lallo G., Kobayashi, G.S., & Maresca, B. (1995). A temperature-sensitive strain of *Histoplasma capsulatum* has an altered delta 9-fatty acid desaturase gene. *Lipids* **30**, 899-906.

Goldman, G. H., dos Reis Marques, E., Duarte Ribeiro, D. C., de Souza Bernardes, L. A., Quiapin, A. C., Vitorelli, P. M., Savoldi, M., Semighini, C. P., de Oliveira, R. C. & other authors (2003). Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryot Cell* **2**, 34-48.

Gomez, B. L., Nosanchuk, J. D., Diez, S., Youngchim, S., Aisen, P., Cano, L. E., Restrepo, A., Casadevall, A. & Hamilton, A. J. (2001). Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. *Infect Immun* **69**, 5760-5767.

Hamilton, A. J. & Gomez, B. L. (2002). Melanins in fungal pathogens. *J Med Microbiol* **51**, 189-191.

Herrero, P., Flores, L., de la Cera, T. & Moreno, F. (1999). Functional characterization of transcriptional regulatory elements in the upstream element of the yeast GLK1 gene. *Biochem J* **343**, 319-325.

Hirano, W., Gotoh, I., Uekita, T. & Seiki, M. (2005). Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail binding protein-1 (MTCBP-1) acts as an eukaryotic aci-

reductone dioxygenase (ARD) in the methionine salvage pathway. *Genes Cells* **10**, 565-574.

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

Kingsbury, J.M., Goldstein, A.L. & McCusker J.H. (2006). Role of nitrogen and carbons transport, regulation and metabolism genes for *Saccharomyces cerevisiae* survival in vivo. *Eukaryot Cell* **5**, 816-824.

Klengel, T., Liang, W. J., Chaupka, J., Ruoff, C., Schröppel, K., Naglik, J. R., Eckert, S. E., Mogensen, E. G., Haynes, K. & other authors (2005). Fungal adenyl cyclase integrates CO₂ sensing with cAMP signaling and virulence. *Curr Biol* **15**, 2021-2026.

Lorenz, M. C. & Fink, G. R. (2001). The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* **412**, 83-86.

Marques, E. R., Ferreira, M. E., Drummond, R. D., Felix, J. M., Menossi, M., Savoldi, M., Travassos, L. R., Puccia, R., Batista, W. L. & other authors (2004). Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. *Mol Genet Genomics* **271**, 667-677.

Mendes-Giannini, M. J., Andreotti, P. F., Vincenzi, L. R., da Silva, J. L., Lenzi, H. L., Benard, G., Zancope-Oliveira, R., de Matos Guedes, H. L. & Soares, C. P. (2006). Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* **8**, 1550-1559.

Mirbod-Donovan, F., Schaller, R., Hung, C. Y., Xue, J., Reichard, U. & Cole, G. T. (2006). Urease produced by *Coccidioides posadassi* contributes to the virulence of this respiratory pathogen. *Infect Immun* **74**, 504-515.

Montenegro, M. R., & Franco, M. (1994). Pathology. In *Paracoccidioidomycosis*. Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno, A., & Del Negro, G. (eds). Boca Raton: CRC, pp. 131-145.

Nunes, L. R., Oliveira, R. C., Leite, D. B., Silva, V. S., Marques, E. R., Ferreira, M. E. S., Ribeiro, D. C., Bernardes, L. A. S., Goldman, M. H. & other authors (2005). Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot Cell* **4**:2115-2128.

Paolo Jr, W. F., Dadachova, E., Mandal, P., Casadevall, A., Szsaniszlo, P. J. & Nosanchuk, J. D. (2006). Effects of disrupting the polyketide synthase gene WdPKS1 in *Wangiella* [Exophiala] dermatitidis on melanin production and resistance to killing by antifungal compounds, enzymatic degradation, and extremes in temperature. *BMC Microbiol* **19**, 55.

Ramírez M.A.& Lorenz M.C. (2007). Mutations in alternative carbon utilization pathways in *Candida albicans* attenuate virulence and confer pleitropic phenotypes. *Eukaryot Cell* **6**, 280-290.

Raugei, G., Modesti, A., Magherini, F., Marzocchini, R., Vecchi, M. & Ramponi, G. (1996). Expression of acylphosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* enhances ethanol fermentation rate. *Biotechnol Appl Biochem* **23**, 273-278.

Restrepo, A., McEwen, J. G. & Castaneda, E. (2001). The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol* **39**, 233-241.

Retallack, D. M., Heinecke, E. L., Gibbons, R., Deepe, G. S. Jr. & Woods, J. P. (1999). The URA5 gene is necessary for *Histoplasma capsulatum* growth during infection of mouse and human cells. *Infect Immun* **67**, 624-629.

Rude, T.H., Tolfaletti, D.L., Cox, G.M. & Perfect, J.R. (2002). Relationship of the glyoxylate pathway and pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **70**, 5684-5694.

Silva, M. B., Marques, A. F., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., Travassos, L. R. & Taborda, C. P. (2006). Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect* **8**, 197-205.

Vigh L., Maresca, B & Horwood, J.L. (1988). Does the membrane physical state control the expression of the heat shock and other genes? *Trends Biochem Sci* **23**, 369-374.

Table 1 - Oligonucleotides primers used in the PCR and or sqRT-PCR.

Sequence name	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	Size of the amplified products
Indigoidine synthase A-like protein (<i>indA</i>)	ATAGCCGACCTGACTGAACCT	CCCTCTTGAATGCCGTAT	323 bp
Oligopeptide transporter protein (<i>opt</i>)	CAAGCGACTGGAGCAACCGA	CTGCGTTGTATTGAAGCCG	228 bp
Rho guanyl nucleotide exchange factor (<i>gef</i>)	TCTCCCAAACGCTGAACACT	ATCAATCGTCCAGAGGGTAG	325 bp
Oxidation resistance 1 protein (<i>oxr1</i>)	TCCCAGTCCGAATCTCAATC	CTGCTCGCAAATGCCTTACA	410 bp
Glucokinase (<i>glk</i>)	GGTCTGGCGTAAATGTGCAC	GGCTGGTAATTGTATCGC	368 bp
Carbonic anhydrase (<i>ca</i>)	ACACGGGACGAAAGCACTAT	AAACCTGCTGGCATTGTGGC	322 bp
Myosin 2 isoform (<i>myo2</i>)	TGGCGAAATCATGAAAGCGG	GGCGGGCACAGCATGGTAA	291bp
Telomerase reverse transcriptase (<i>tert</i>)	TGGGAACATCATCGACACGT	GGCTGCCATAGTCCGAATAA	343 bp
Poly (A) polymerase 1 (<i>pap1</i>)	TCGCGATCCCATAAACCTT	GACGAGTTGGACCTTCACCT	345 bp
Orotate phosphoribosyltransferase (<i>ura5</i>)	CAGCTGCAGTCGTTACAACA	GGGTTGGAGGAGAGGAAAG	249 bp
Patatin-like serine hydrolase (<i>pat</i>)	GGATCATGTGCTCGCTAC	GGGAAGAGATCGATTGAGG	468 bp
Squalene synthase (<i>erg9</i>)	GCTGACTATTGCCGAAAGG	GTTCGAGGGTTGCAATGGC	460 bp
Ribosomal L34 protein (<i>l34</i>)	ATT CCTGCCCTCCGACCC	CCCGCCATTCTCGTCCCGC	750 bp
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (<i>gapdh</i>)	CAGACAGCTGCATCTTCT	TCTCTCTTCCCTTGCG	1106 bp

**Table 2 – Identification of the highly abundant clusters (\geq 10 reads) of *P. brasiliensis* transcripts.
50 ORFs representing the highest number of ESTs in the cDNA library are listed.**

Gene product	Best BLASTX match / GenBank Accession number	e-value	Enzyme Commission Number	Redundancy	Metabolic Role
ADP-ribosylation factor	<i>Ajellomyces capsulata</i> / D49993	4e -67	--	13	Protein trafficking in the Golgi apparatus
ADY2 - Protein essential for the acetate permease activity	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_409363.1	3e -47	--	12	Acetate transmembrane transport
Coatomer zeta subunit [†]	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_410217.1	1e -67	--	14	Protein transport to Golgi
Copper transport protein *	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_407254.1	4e -56	--	55	Copper transport
GTP-binding protein of the rab family	<i>Neurospora crassa</i> / gi 384298	1e -22	--	10	ER to Golgi secretory pathway
High affinity methionine permease *	<i>Yarrowia lipolytica</i> / XP_505883.1	8e -52	--	11	Methionine transport
Lipocalin-1-interacting membrane receptor *	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_408348.1	2e -36	--	12	Transport of small hydrophobic molecules
MFS peptide transporter *	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_407545.1	3e -63	--	14	Peptide transport
Mitochondrial succinate-fumarate transporter *	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_411424.1	9e -28	--	15	Succinate and fumarate transport
Heat shock protein 30 - HSP30	<i>Aspergillus oryzae</i> / BAD02411.1	5e -47	--	18	Stress related
Heat shock protein 70 - HSP70	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> /AAK66771.1	6e -74	--	16	Stress related
Heat shock protein 90 - HSP90	<i>Aspergillus niger</i> / CAA72292	1e -49	--	10	Stress related
Heat-shock inducible inhibitor of cell growth *	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_413217.1	6e -46	--	14	Stress related
Rho1 GTPase *	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> /AAQ93069.2	2e -78	--	13	Stress related
3-Isopropylmalate dehydrogenase *	<i>Aspergillus nidulans</i> / gi 50083229	2e -80	1.1.1.85	10	Nitrogen metabolism/ Leucin biosynthesis
Aromatic-L-amino-acid decarboxylase	<i>Gibberella zeae</i> / XP_385471.1	5e -46	4.1.1.28	23	Nitrogen metabolism/ Melanin biosynthesis
Cystathione beta-synthase *	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_409957.1	9e -87	4.2.1.22	11	Nitrogen metabolism/ Cystein biosynthesis
Formamidase	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> / gi 47118080	3e -94	3.5.1.49	10	Nitrogen metabolism /

					Production of ammonia
Glutamine synthetase *	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_408296.1	3e -64	6.3.1.2	11	Nitrogen metabolism/ Glutamine biosynthesis
Homocitrate synthase *	<i>Aspergillus fumigatus</i> / XP_751780.1	0.0	2.3.3.14	26	Lysine biosynthesis
Alcohol dehydrogenase I	<i>Neurospora crassa</i> / gi 7800883	2e -47	1.1.99.8	27	Anaerobic respiration
Glucokinase [†]	<i>Escherichia coli</i> / gi 15802930	3e -79	2.7.1.2	45	Carbohydrate metabolism/ Glycolysis
Phosphoglycerate mutase *	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_406010.1	1e -40	5.4.2.1	13	Carbohydrate metabolism/ Glycolysis
Isocitrate lyase *	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> / AY350913.2	7e -51	4.1.3.1	13	Glyoxylate cycle
Chitinase family 18 *	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> / AAQ75798	7e -55	3.2.1.14	10	Cell wall metabolism/ Hydrolysis of chitin
UDP-glucose pyrophosphorylase *	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_413285.1	6e -70	2.7.7.9	12	Carbohydrate metabolism/ Biosynthesis of cell wall components
ATP synthase F0 F1 subunit 9 *	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_408635.1	2e -44	3.6.3.14	88	Aerobic respiration
Flavodoxin-like protein	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_404434.1	3e -54	--	17	Aerobic respiration
Choline-sulfatase	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_409586.1	1e -53	3.1.6.6	16	Sulfur metabolism
Sulfate adenyltransferase	<i>Aspergillus niger</i> / AF538692.1	4e -105	2.7.7.4	17	Sulfur metabolism / Sulfate assimilation
Carbonic anhydrase [†]	<i>Magnaporthe grisea</i> / XP_364389.1	4e -36	4.2.1.1	11	Lipid biosynthesis/HCO ₃ ⁻ production
Delta-9-fatty acid desaturase *	<i>Ajellomyces capsulatus</i> / gi 46395695	7e -102	1.14.19.1	22	Lipid metabolism/ Monounsaturated fatty acid biosynthesis
Malic enzyme *	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_410305.1	2e -89	1.1.1.40	11	Related to fatty acid biosynthesis
Long chain base-responsive inhibitor of protein kinases Pkh1p and Pkh2p *	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_409354.1	7e -45	--	11	Protein activity regulation
Ornithine decarboxylase antizyme	<i>Emericella nidulans</i> / AF291577.1	1e -26	--	10	Proteasomal ubiquitin degradation

Protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase 1 *	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_407601.1	5e -55	2.1.1.77	14	Protein fate/ Repair of β -aspartyl linkages
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Neurospora crassa</i> / gi 38567156	1e -61	5.2.1.8	17	Protein fate/ Regulation of RNA transcription and splicing
Polyubiquitin	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> / AAC64787.1	3e -65	--	33	Protein degradation
Probable type-III integral membrane protein †	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_406436.1	5e -25	--	10	Not defined
Serine proteinase *	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> / AAP83193	1e -85	3.4.21.-	14	Protein degradation
Ubiquitin-conjugating enzyme E2	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_407263.1	1e -64	6.3.2.-	12	Protein degradation
3-Dimethylubiquinone-9 3-methyltransferase *	<i>Coccidioides immitis</i> / XP_001248608.1	6e -38	2.1.1.64	20	Ubiquinone biosynthesis
Ferrochelatase *	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_411889.1	3e -76	4.99.1.1	10	Porphyrin metabolism/ Insertion of iron into heme
Elongation factor 1-alpha	<i>Coccidioides immitis</i> / AAK54650	4e -80	--	13	Protein biosynthesis
Histone H2A*	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_412176.1	3e -54	--	19	Nucleosome assembly
Nucleosome assembly protein *	<i>Gibberella zeae</i> / XP_387643.1	5e -55	--	10	H2A and H2B nucleosome assembly
Small nuclear ribonucleoprotein U6 *	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_404184.1	1e -33	--	10	RNA metabolism / RNA splicing
Transcription factor spt3 *	<i>Aspergillus fumigatus</i> / CAF32113	3e -48	--	16	Transcription/ Assembly of RNA polymerase
Translation initiation factor subunit Sui1	<i>Gibberella zeae</i> / XP_389056.1	4e -49	--	12	Protein biosynthesis / Ribosomal recognition of the initiation codon
CAP20-virulence factor *	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_408358.1	3e -38	--	40	Not defined

* Over expressed in comparison to the transcriptome of the *in vitro* cultured yeast cells (<https://dna.biomol.unb.br/Pb/>).

† Novel genes of *P. brasiliensis* as defined by comparison to the transcriptome of *in vitro* cultured yeast cells and to the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Table 3 - KEGG pathway mapping for novel and up regulated genes of *P. brasiliensis* yeast cells recovered from infected mouse liver.

KEGG Pathway	Number of Sequences		Percentage of total	
	Novel	Up regulated	Novel †	Up regulated *
Carbohydrate Metabolism	Glycolysis / Gluconeogenesis	53	-	3.03
	Pyruvate metabolism	-	32	-
	Pentose phosphate pathway	3	-	0.17
	Glycogen Metabolism	2	-	0.11
	Citrate cycle (TCA cycle)	-	24	-
	Aminosugars metabolism	-	16	-
	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	-	13	-
	Nucleotide sugars metabolism	-	12	-
Energy Metabolism	Nitrogen metabolism	8	-	0.46
	Oxidative phosphorylation	9	99	0.51
Nucleotide Metabolism	Purine and Pyrimidine metabolism	5	4	0.28
Amino Acid Metabolism	Tryptophan metabolism	3	-	0.17
	Alanine and aspartate metabolism	1	9	0.06
	Glycine, serine and threonine metabolism	-	11	-
	Glutamate metabolism	-	27	-
	Valine, leucine and isoleucine degradation	2	4	0.11
	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	1	10	0.05
	Methionine metabolism	-	4	-
	Urea cycle and metabolism of amino groups	-	7	-
	Cysteine metabolism	1	-	0.06

Lipid Metabolism	Fatty acid metabolism	1	8	0.06	0.67
	Glycerophospholipid metabolism	4	7	0.23	0.58
	Glycerolipid metabolism	-	6	-	0.50
	Linoleic acid metabolism	2	-	0.11	-
	Biosynthesis of steroids	4	-	0.23	-
Metabolism of Cofactors and Vitamins	Ubiquinone biosynthesis	-	40	-	3.35
	Porphyrin and chlorophyll metabolism	-	10	-	0.83
	Nicotinate and nicotinamide metabolism	1	-	0.06	-
	Folate biosynthesis	-	8	-	0.67
Cell Growth and Death	Cell Cycle	1	-	0.06	-
Transcription	RNA polymerase	8	5	0.46	0.42
Replication and Repair	DNA polymerase	-	4	-	0.33
Protein Folding, Sorting and Degradation	Ubiquitin mediated proteolysis	-	14	-	1.17
Signal Transduction	Calcium signaling pathway	-	6	-	0.50
	Phosphatidylinositol signaling system	1	-	0.06	-

[†]That is, percentage in relation to the total number of novel genes.

^{*}That is, percentage in relation to the total number of over expressed genes.

Table 4 – Genes involved in carbohydrate, lipids, amino acids and energy yielding metabolism over regulated or novel present in the transcriptome of *P. brasiliensis* yeast cells recovered from liver of infected mice.

Pathway	Gene Product	Enzyme Commission	Redundancy
Carbohydrate synthesis and degradation			
	Acylphosphatase - (AcP) †	3.6.1.7	6
	D-ribose-5-phosphate ketol-isomerase (RIP5) †	5.3.1.6	3
	Glucokinase (GLK1) †	2.7.1.2	45
	Glycogen phosphorylase 1 - (GPH1) †	2.4.1.1	2
	MFS1 – Monosaccharide Transporter *	--	9
	MFS2 - Glucose transporter †	--	3
	Phosphotransferase system, phosphocarrier HPR protein (PTS) †	2.7.3.9	2
	Quinoprotein alcohol dehydrogenase family protein †	1.1.99.8	7
Lipid/Phospholipid synthesis and degradation			
	Acetyl-CoA carboxylase *	6.4.1.2	6
	Carbonic anhydrase †	4.2.1.1	11
	Delta 8-sphingolipid desaturase †	1.14.-.-	1
	Delta(24)-sterol C-methyltransferase - (ERG6) *	2.1.1.41	6
	Delta-9-fatty acid desaturase (OLE1) *	1.14.19.1	22
	Fatty-acid-CoA synthase (beta-subunit) *	2.3.1.1.86	8
	Malate dehydrogenase cytosolic (MDH) *	1.1.1.37	11
	Member of the MBOAT family of putative membrane-bound O-acyltransferases (Yor175cp) †	--	1
	Patatin-like serine hydrolase (phospholipase A2 activity) †	--	2
	Phosphatidic acid-preferring phospholipase A1 †	3.1.1.32	1
	Squalene synthetase – (ERG9) †	2.5.1.21	1
TCA cycle and Glyoxylate cycle			
	Carnitine/acylcarnitine translocase (CACT) †	2.3.1.-	1
	Carnitine acetyl transferase (CAT) *	2.3.1.7	9
	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase *	4.1.3.4	4

Oxidation of NADH and energy generation

ATP synthase F0 F1 J chain *	3.6.3.14	7
ATP synthase F0 F1 subunit 9 *	3.6.3.14	88
ATP synthase F0 F1 subunit e, (TIM11l) †#	3.6.3.14	1
Cytochrome c oxidase subunit VIIa †	1.9.3.1	6
Cytochrome-c oxidase subunit I - (COX1) †	1.9.3.1	4

Nitrogen/Amino acid metabolism

3-isopropylmalate dehydrogenase (Leu2) *	1.1.1.85	10
Adenylosuccinate lyase (ADE13) †	4.3.2.2	1
Asparagine synthase - (AS) †	6.3.5.4	1
Aci-reductone dioxygenase 1- (ARD) †	1.13.11.54	1
Cystathionine beta-synthase (CYS4) *	4.2.1.22	11
Cysteine synthase B †	2.5.1.47	1
Glutamine synthetase *	6.3.1.2	11
High affinity methionine permease *	--	11
Homocitrate synthase *	2.3.3.14	26
Imidazole glycerol phosphate synthase hisHF - (IGP synthase) †	2.4.2.-	1
Lysine-specific permease – (LYP1) †	--	8
Nmra - nitrogen metabolite repression regulator *	--	5
Orotate phosphoribosyltransferase (URA5) †‡	2.4.2.10	5
Urease *	3.5.1.5	7

* Over expressed genes identified in *P. brasiliensis* transcriptome of yeast cells recovered from infected mouse liver.

† Novel genes identified in *P. brasiliensis* transcriptome of yeast cells recovered from infected mouse liver.

Genes not described previously in *P. brasiliensis* isolate *Pb01*, but present in public databases.

‡ Novel transcripts also detected during *P. brasiliensis* dimorphic transition transcriptome (Bastos *et al.*, 2007).

Supplementary Table 1 – The overexpressed transcripts in yeast cells recovered from infected mouse liver.

MIPS Category	Gene Product	Best Hit	e-value	Enzymne Commission	Redundancy	
					I •	Y •
Metabolism	3-dimethylubiquinone-9 3-methyltransferase	<i>Coccidioides immitis</i> / XP_001248608.1	6e-38	2.1.1.64	20	7
	3-isopropylmalate dehydrogenase - (leu2)	<i>Aspergillus nidulans</i> / gi 50083229	2e -80	1.1.1.85	10	4
	Acetylcholinesterase	<i>Gibberella zaeae</i> / XP_383120.1	5e-52	3.1.1.7	7	1
	Acetyl-CoA carboxylase	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_411901.1	7e-50	6.4.1.2	6	0
	Cystathionine beta-synthase (CYS4)	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_409957.1	9e -87	4.2.1.22	11	3
	Delta-9-fatty acid desaturase (OLE1)	<i>Ajellomyces capsulatus</i> / gi 46395695	7e -102	1.14.19.1	22	19
	Delta(24)-sterol C-methyltransferase - (ERG 6)	<i>Gibberella zaeae</i> / XP_382959.1	4e -81	2.1.1.41	6	0
	Fatty-acid-CoA synthase (beta-subunit)	<i>Emericella nidulans</i> / U75347.1	5e -64	2.3.1.1.86	8	0
	Ferrochelatase	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_411889.1	3e-76	4.99.1.1	10	6
	Folylpolyglutamate synthase	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_407977.1	1e -40	6.3.2.17	8	0
	Glutamine synthetase	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_408296.1	3e -64	6.3.1.2	11	6
	Homocitrate synthase	<i>Aspergillus fumigatus</i> / XP_751780.1	0.0	2.3.3.14	26	21
	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_410419.1	3e-49	4.1.3.4	4	0
	Isocitrate lyase 2	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> / AY350913.2	7e-51	4.1.3.1	13	4
	Lactam utilization protein (lamb)	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_405023.1	5e-74	-	8	3
	Lipase ATG15	<i>Magnaporthe grisea</i> / XP_369962.1	1e-17	3.1.1.3	6	1
	Siroheme synthase	<i>Gibberella zaeae</i> / XP_384398.1	4e-54	-	6	2
	Succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_407966.1	5e -78	1.2.1.16	6	0
	Succinyl-CoA synthetase beta subunit	<i>Neurospora crassa</i> / CAB92021.1	1e-29	6.2.1.5	6	1
	Ubie/COQ5 family methyltransferase	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_408762.1	1e -06	2.1.1.-	5	1
	Urease	<i>Aspergillus fumigatus</i> / AJ578495.1	4e -40	3.5.1.5	7	4
Energy	ATP synthase F0 F1 subunit 9	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_408635.1	2e -44	3.6.3.14	88	4
	ATP synthase J chain, mitochondrial	<i>Gibberella zaeae</i> / XP_389606.1	4e-09	3.6.3.14	7	4
	Carnitine acetyl transferase	<i>Aspergillus fumigatus</i> / gi 41581312	9e -71	2.3.1.7	9	0
	Malic enzyme	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_410305.1	2e -89	1.1.1.40	11	-

	UDP-glucose pyrophosphorylase	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_413285.1	6e -70	2.7.7.9	12	2
Cell Cycle and DNA Processing	Cap20	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_408358.1	3e-38	-	40	4
	DNA polymerase delta 55 kda subunit	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_407994.1	1e-38	2.7.7.7	4	0
	Histone H2A	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_412176.1	3e -54	-	19	3
	MSH2 - DNA mismatch repair protein	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_409143.1	4e -56	-	4	0
	Nucleosome assembly protein	<i>Gibberella zae</i> / XP_387643.1	5e -55	-	10	2
	Pregnancy-induced growth inhibitor OKL38	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_404770.1	6e-19	-	4	0
	Ubiquitin-conjugating enzyme variant MMS2	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_407781.1	2e-59	6.3.2.19	6	0
	Vam7p-possible regulator of vacuolar morphogenesis	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_408688.1	1e-34	-	7	3
Transcription	Leucine zipper; cross-pathway control protein A	<i>Aspergillus niger</i> / CAA67605	3e -11	-	9	2
	Myb-like DNA-binding domain protein	<i>Magnaporthe grisea</i> / XP_368111.1	2e -30	-	7	4
	Nmra - nitrogen metabolite repression regulator	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_412305.1	e-58	-	5	1
	Nucleolar complex protein 14	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_405571.1	3e-33	-	9	2
	RNA processing factor 1	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_412971.1	6e-31	-	5	1
	SCON - sulphur metabolism negative regulator	<i>Microsporum canis</i> / AF408428	3e-33	-	9	2
	Small nuclear ribonucleoprotein E	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_410872.1	2e -12	-	6	2
	Splicing factor 3b subunit 3, 130kda	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_409589.1	2e -76	-	5	1
	Transcription elongation factor 1	<i>Gibberella zae</i> / XP_387652.1	1e-32	-	4	0
	Transcriptional activator protein DAL81	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_408626.1	7e-55	-	8	0
	U6 small nuclear ribonucleoprotein (Lsm3)	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_404184.1	1e-33	-	10	2
	Zinc finger transcription factor AE1 C	<i>Gibberella zae</i> / AAT35113	6e-05	-	6	1
Protein Synthesis	50S ribosomal subunit protein L15	<i>Aspergillus fumigatus</i> / CAE47918.1	3e -32	-	7	2
	60S ribosomal protein L23	<i>Neurospora crassa</i> / EAA33841.1	1e-53	-	9	2
	Cytoplasmic methionyl-tRNA synthetase	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_405517.1	3e -93	6.1.1.10	4	0
	Eukaryotic translation initiation factor 6	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_412961.1	2e -11	-	9	1

Protein Fate	Protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase 1	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_407601.1	5e-55	2.1.1.77	14	2
	RAM2 - caax farnesyltransferase alpha subunit	<i>Emericella nidulans</i> / DAA01790	9e-40	2.5.1.58	6	2
	Zinc finger, C3HC4 type	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> / CAB08748.1	1e-10	-	7	4
Transport Facilitation	ATP-binding cassette transporter (ABC)	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_412949.1	7e -62	-	8	2
	Cation transport-related protein	<i>Neurospora crassa</i> / CAD70889.1	6e-22	-	9	1
	Chloride channel protein 5	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_410244.1	1e-32	-	5	0
	Copper transport protein	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_407254.1	4e -56	-	55	40
	Exportin 1	<i>Emericella nidulans</i> / AAS68344	8e -105	-	9	3
	High affinity methionine permease	<i>Yarrowia lipolytica</i> / XP_505883.1	8e-52	-	11	3
	Magnesium transporter ALR1	<i>Coccidioides immitis</i> / XP_001242345.1	4e -07	-	6	1
	Mitochondrial succinate-fumarate transporter (ACR1)	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_411424.1	9e-28	-	15	1
	MFS 1 monosaccharide transporter	<i>Magnaporthe grisea</i> / XP_370190.1	e-58	-	9	3
	MFS peptide transporter Ptr2	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_407545.1	3e -63	-	14	3
	Nuclear pore membrane glycoprotein	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_407591.1	4e-28	-	5	1
	Calcium P-type ATPase	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_405326.1	1e -44	3.6.3.8	6	2
	RAB GDP-dissociation inhibitor	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_410032.1	2e-55	-	5	1
	Transport protein particle (TRAPP) component, Bet3	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_410635.1	2e -64	-	5	1
Signal Transduction	Lipocalin-1-interacting membrane receptor (LMBR1L)	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_408348.1	2e-36	-	12	3
	PRM1- Pheromone-regulated multispanning membrane protein involved in membrane fusion during mating	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_409751.1	4e-51	-	5	1
	Rho1 GTPase	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> / AQ93069.2	2e -78	-	13	10
	WD-40 repeat domain protein	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_411842.1	e-11	-	7	1
Cell Rescue, Defense and Virulence	Aspartyl aminopeptidase	<i>Coccidioides immitis</i> / AAL16034.1	1e -43	3.4.11.21	5	1
	Heat-shock inducible inhibitor of cell growth (HMF1)	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_413217.1	6e -46	-	14	
	Protease propeptides/inhibitors superfamily protein	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_409262.1	5e-13	-	6	

Serine proteinase	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> / AAP83193	1e -85	3.4.21.-	14	12
SPT3 - transcription factor spt3	<i>Aspergillus fumigatus</i> / CAF32113	3e -48	-	16	4
Thioredoxin family TRP 26 protein	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_405501.1	5e-54	1.8.1.8	5	1
Biogenesis of Cellular Components					
Chitin synthase 4	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> / AAD19613	2e-83	2.4.1.16	6	0
Chitinase family 18	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> / AAQ75798	7e -55	3.2.1.14	10	2
Profilin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> / CAA99321.1	1e -11	-	8	3
YSC84 - Protein involved in the organization of actin cytoskeleton	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_408305.1	6e -25	-	6	1
Cell Type Differentiation					
TPM2 - tropomyosin isoform II	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_409823.1	3e-42	-	4	0
Protein Activity Regulation					
Ornithine decarboxylase antizyme	<i>Emericella nidulans</i> / AF291577.1	1e-26	-	10	2
PIL1 - Long chain base-responsive inhibitor of protein kinases Pkh1p and Pkh2p	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_409354.1	7e -45	-	11	2
Protein With Binding Function or Cofactor Requirement					
RNA-binding protein	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_410813.1	4e -35	-	5	1
Functional Unclassified Proteins					
Phosphoglycerate mutase-like superfamily protein	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_406010.1	1e -40	-	13	1
Unclassified Proteins				289	57

• ESTs in the cDNA library of yeast cells recovered from infected mice.

• ESTs in the cDNA library of yeast cells *in vitro* cultured.

Supplementary Table 2 - Novel genes detected in *P. brasiliensis* yeast cells recovered from infected mouse liver

MIPS Category	Gene product	Best Hit / Accession number	e-value	Redundancy
Metabolism	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase biotin-containing subunit †	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_408827.1	e-49	2

Aci-reductone dioxygenase 1- (ARD)	<i>Aspergillus nidulans</i> / gi 40738915	e-35	1
Adenylosuccinate lyase – (ADE13)	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_410346.1	e-54	1
Alpha-amylase amyE	<i>Aspergillus oryzae</i> /BAC55903	e-06	1
Asparagine synthase	<i>Gibberella zaeae</i> /XP_380780.1	e-24	1
Bifunctional P-450 (NADPH-P450 reductase) ‡	<i>Neurospora crassa</i> /EAA26697.1	e-30	1
Carbonic anhydrase	<i>Magnaporthe grisea</i> /XP_364389.1	4e-36	11
Cellobiose dehydrogenase	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_406757.1	e-42	3
Cholestenol delta-isomerase	<i>Gibberella zaeae</i> /XP_391107.1	e-29	4
Cysteine synthase B	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_411250.1	e-25	1
Delta 8-sphingolipid desaturase ††	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_408729.1	e-33	1
FAD/NAD(P)-binding domain protein	<i>Gibberella zaeae</i> /XP_389391.1	e-10	1
Glycosyl hydrolase ‡	<i>Neurospora crassa</i> /EAA36079.1	e-10	4
Glycosyl hydrolase family 76 ††	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_404890.1	e-60	5
Imidazole glycerol phosphate synthase hisHF - (IGP synthase) #	<i>Gibberella zaeae</i> /XP_390160.1	e-16	1
LaeA methyltransferase	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_406221.1	e-05	3
Linoleate diol synthase precursor	<i>Aspergillus nidulans</i> /AAT36614.1	e-77	1
Member of the MBOAT family of putative membrane-bound O-acyltransferases (Yor175cp)	<i>Magnaporthe grisea</i> /XP_364011.1	e-25	1
Mitochondrial oligoribonuclease	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_407005.1	e-61	2
NAD dependent epimerase/dehydratase family protein	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_404391.1	e-40	1
NAD ⁺ kinase, putative	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_410961.1	e-05	1
Orotate phosphoribosyltransferase (URA5) ‡	<i>Ajellomyces capsulatus</i> /AAC62627	e-57	5
Phosphatidic acid-preferring phospholipase A1	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_411741.1	e-46	1
Phosphatidylglycerophosphate synthase (PGS1)	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_406398.1	e-61	3
Polyketide synthase	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> /AY495651	e-08	6

Squalene synthetase (ERG9)		<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_407513.1	e-75	1
Energy				
	Acylphosphatase	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_406235.1	e-16	6
	ATP synthase F0 F1 subunit alpha/beta	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_408635.1	e-44	6
	ATP synthase F0 F1 subunit e, mitochondrial (TIM11) [#]	<i>Neurospora crassa</i> /EAA29679.1	e-09	1
	Cytochrome-C oxidase subunit I – (COX1)	<i>Emericella nidulans</i> /CAA25373	e-27	4
	D-Ribose-5-phosphate ketol-isomerase	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_406577.1	e-59	3
Glucokinase				
	Glycogen phosphorylase 1 - (GPH1) [#]	<i>Escherichia coli</i> /NP_288958.1	9e-82	45
	Mitochondrial cytochrome C oxidase subunit VIIa	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_405152.1	e-57	2
	NADH oxidase (flavin reductase family protein)	<i>Neurospora crassa</i> /EAA32034.1	e-08	6
	Probable type-III integral membrane protein - YTP1 (yeast putative transmembrane)	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_406436.1	5e -25	10
	Quinoprotein alcohol dehydrogenase family protein	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_404456.1	e-13	7
Transcription				
	C2H2 type zinc finger domain protein [‡]	<i>Gibberella zae</i> /XP_387110.1	e-45	4
	Dead-box family ATP dependent RNA helicase DOB1	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_408549.1	e-39	4
	DNA directed RNA polymerase III subunit (C74)	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_412409.1	e-58	4
	DNA methylase	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_410850.1	e-30	1
	Elongin C transcription elongation factor (ELC1)	<i>Magnaporthe grisea</i> / XP_361428.1	8e -21	4
	Multicopy Suppressor of STA genes - MSS11(YMR164C)	No hits found	-	1
	Nucleolar RNA methyltransferase	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_412210.1	e-08	1
	Poly(A) polymerase 1 (PAP 1) [#]	<i>Magnaporthe grisea</i> / XP_369343.1	2e -33	9
	RNA polymerase II subunit 1	<i>Aspergillus oryzae</i> /BAB12227	e-56	3
	RNA polymerase III subunit C11	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_408356.1	e-45	1

RNA polymerase I-specific transcription initiation factor RRN6	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_405528.1	e-15	5
Transcription factor; WD40 repeat protein [#]	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_406351.1	e-33	1
Transcription regulator meaB	<i>Neurospora crassa</i> /EAA28458.1	e-06	1
Transcriptional activator Mut3p [#] [‡]	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_408695.1	e-75	3
TRM112 - Subunit of an adoMet-dependent tRNA methyltransferase (MTase) complex (Trm11p-Trm112p)	<i>Gibberella zeae</i> /XP_387616.1	e-34	1
U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	<i>Neurospora crassa</i> /BX842634.1	e-14	1
<hr/>			
Cell cycle and DNA processing			
Actin related protein 2/3 complex, subunit 2	<i>Magnaporthe grisea</i> /XP_362300.1	e-20	1
Alkylated DNA repair protein	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_408095.1	e-09	2
Arginine N-methyltransferase A	<i>Emericella nidulans</i> /AAQ02691	e-33	3
ATP- dependent DNA helicase, 70 kDa subunit – (Ku70)	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_411890.1	e-49	6
BimE (blocked-in-mitosis) protein	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_406909.1	e-32	1
Bir1 - Chromosome segregation protein cut17	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_404852.1	e-32	3
Brefeldin A resistance protein 1 – (BFR1)	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_408641.1	e-64	5
Budding Uninhibited by Benzimidazole - (BUB2)	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_404418.1	e-77	3
Defective in Mitotic Arrest - DMA2	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_411045.1	e-71	2
DNA polymerase Tdt-N – Terminal deoxynucleotidyl transferase	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_410251.1	e-39	1
DNA repair protein Rad14	<i>Gibberella zeae</i> /XP_381842.1	e-18	4
Double-strand-break repair protein Rad21 [#]	<i>Neurospora crassa</i> /EAA34981.1	e-32	2
<hr/>			
Histone acetyltransferase component Tra1p fragment	<i>Aspergillus fumigatus</i> /AAC50033	e-35	1
Proliferating cell nuclear antigen - (PCNA) [#] [‡]	<i>Magnaporthe grisea</i> /XP_368726.1	e-41	1
RAD50-interacting protein 1	<i>Neurospora crassa</i> /CAF05877.1	e-06	2
Reduced growth phenotype protein (RGP1) [#]	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_410426.1	e-55	3

S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases					
Superfamily protein	<i>Magnaporthe grisea</i> /XP_364370.1	e-20	1		
SCF (SKP1-CUL1-F-box protein) complex protein Cullin-1	<i>Aspergillus fumigatus</i> /CAF32011	e-81	3		
Telomerase reverse transcriptase - (TERT)	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_407890.1	e-16	9		
<hr/>					
Protein Synthesis					
Histidyl tRNA-specific guanylyltransferase	<i>Neurospora crassa</i> /EAA34863.1	e-58	1		
Leucyl-tRNA synthetase	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_407839.1	e-62	1		
Mitochondrial 60S ribosomal protein L33	<i>Magnaporthe grisea</i> /XP_370221.1	e-23	2		
Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit L51 -(MRPL51)	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_411041.1	e-36	1		
Unhealthy ribosome biogenesis - (URB1)	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_404374.1	e-42	1		
<hr/>					
Protein Fate					
Nuclear protein localization factor and ER translocation component -(NPL4)	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_404432.1	e-53	4		
Protein phosphatase 2C	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_409859.1	5e -55	5		
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	<i>Coccidioides posadasii</i> /AAG00799	e-53	2		
Ubiquitin conjugating enzyme 7 interacting protein 4-like	<i>Oryza sativa</i> /BAD29345	e-07	2		
Ubiquitin domain protein	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_405310.1	e-18	3		
Ubiquitin-protein ligase E3	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_408060.1	e-34	2		
Vacuolar Protein Sorting 70 - (VPS70)	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_408155.1	e-52	5		
<hr/>					
Transport facilitation					
Carnitine-acylcarnitine translocase [#]	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_408489.1	e-50	1		
Chloride channel CLC-3	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_410448.1	e-34	5		
Clathrin assembly protein AP47	<i>Gibberella zeae</i> /XP_389158.1	e-57	1		
Clathrin heavy chain 1- CHC1 [#]	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_408600.1	e-72	4		
Coatomer zeta subunit	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_410217.1	1e -67	14		

Implicated in Zinc Homeostasis, membran protein – (IZH3)	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_409288.1	e-68	2
Integral membrane protein Ptm1	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_404200.1	e-16	2
Lysine-specific permease – (LYP1)	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_406605.1	e -57	8
MFS2 glucose transporter #	<i>Gibberella zeae</i> /XP_383391.1	e-18	3
Midline 1 - MID1 #	<i>Aspergillus nidulans</i> / AAM47512.1	1e -12	2
Myosin 2 isoform (MYO2)	<i>Magnaporthe grisea</i> / XP_370426.1	7e -54	5
Neuronal Calcium Sensor - (NCS1)	<i>Magnaporthe grisea</i> /XP_362419.1	e-24	1
Oligopeptide transporter protein - (OPT)	<i>Magnaporthe grisea</i> /XP_361774.1	e-20	6
Phosphotransferase system, phosphocarrier HPr protein (PTS)	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_411319.1	e-46	2
Protein transport protein Sec61, alpha subunit	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_411858.1	e-80	4
Protein YLH47, mitochondrial LETM1 homolog (YLH47 / Ypr125wp)	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_407076.1	e-29	3
Tctex1- complex testis-expressed 1 Dynein light chain	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_405470.1	e-31	1
TRK1 - Low-affinity potassium transport protein	<i>Debaryomyces hansenii</i> /XP_456781.1	e-35	1
YET3 - endoplasmic reticulum transmembrane protein 3 #	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_404956.1	e-35	1
YIP3 - prenylated Rab acceptor 1 #	<i>Magnaporthe grisea</i> /XP_367817.1	e-29	5
<hr/>			
Cell rescue, defence and virulence			
Amidase	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> / CAB60011.1	4e -24	3
Apg17 - autophagy protein	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_410497.1	e-41	4
DAD1 - defender against cell death 1 #	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_408168.1	e-27	4
Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_411429.1	e-29	1
Indigoidine synthase A-like protein	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP_411608.1	e-28	3
OXR1 – (oxidation resistance)	<i>Aspergillus nidulans</i> / XP_407141.1	1e -24	3
Patatin-like serine hydrolase	<i>Magnaporthe grisea</i> /XP_369321.1	e-23	2

Signal transduction	1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase (FAB1)	<i>Gibberella zae/XP_380466.1</i>	e-63	2
	Armadillo repeat protein	<i>Aspergillus nidulans/XP_409294.1</i>	e-10	1
	cAMP-independent regulatory protein pac2	<i>Aspergillus nidulans/XP_407211.1</i>	e-14	2
	RabGAP/TBC domain-containing protein	<i>Aspergillus nidulans/XP_404710.1</i>	e-53	2
	Rho guanyl nucleotide exchange factor	<i>Aspergillus nidulans / XP_404250.1</i>	4e -52	5
	SH3-homology domain protein	<i>Aspergillus fumigatus/CAE47916</i>	e-24	1
	Sit4-associating protein sap185	<i>Aspergillus nidulans/XP_409768.1</i>	e-70	1
Protein with binding function or cofactor requirement	HIT-like superfamily protein (histidine triad, HIT, superfamily of nucleotide- binding proteins)	<i>Gibberella zae/XP_387321.1</i>	e-19	1
Biogenesis of Cellular Components	Bem1 (One) Interacting protein – BOI2	<i>Aspergillus nidulans / XP_408633.1</i>	3e -42	8
	Member of the Puf family of RNA-binding proteins – Just Say No - Jsn1 (YJR091C)	<i>Aspergillus nidulans/XP_411611.1</i>	e-48	1
	Putative integral membrane protein that interacts with Rpp0p (Yfl034wp)	<i>Aspergillus nidulans / XP_408165.1</i>	4e -44	3
	Reversal Of Tor2 lethality - ROT1 (YMR200W)	<i>Yarrowia lipolytica/XP_500467.1</i>	e-38	2
	RNA guanylyltransferase	<i>Aspergillus nidulans/XP_408194.1</i>	e-32	1
	<i>S. cerevisiae</i> Calponin - Scp1p (YOR367W)	<i>Aspergillus nidulans/XP_406072.1</i>	e-07	2
	SMP2 protein (YMR165C)	<i>Aspergillus nidulans/XP_404939.1</i>	e-56	1
Development	HGH1 - (YGR187C)	<i>Aspergillus nidulans/XP_413546.1</i>	e-32	2
Transposable Elements Viral and Plasmid Proteins	Retrotransposon RIRE1 poly protein	<i>Aspergillus nidulans/XP_409364.1</i>	e-09	2

Functional unclassified25

[#] Genes not described previously in *P. brasiliensis* isolate *Pb01*, but present in public databases.

[‡] Novel transcripts also detected during *P. brasiliensis* mycelium to yeast transition transcriptome (Bastos *et al.*, 2007).

^{||} Novel transcripts also detected in *P. brasiliensis* during incubation with human plasma (Bailão *et al.*, 2007).

^{|||} Novel transcripts also detected in *P. brasiliensis* during incubation with human blood (Bailão *et al.*, 2006).

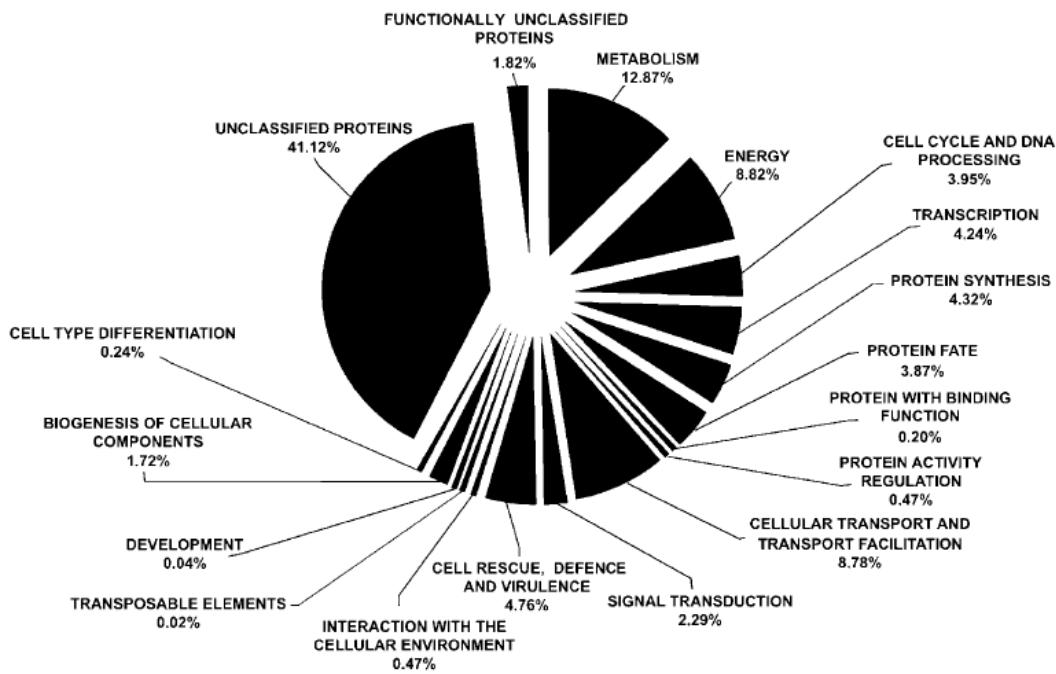


Figure 1: Overview of the ESTs from *P. brasiliensis* transcriptome. Classification of the ESTs based on E value and according to the functional categories developed on MIPS functional annotation scheme.

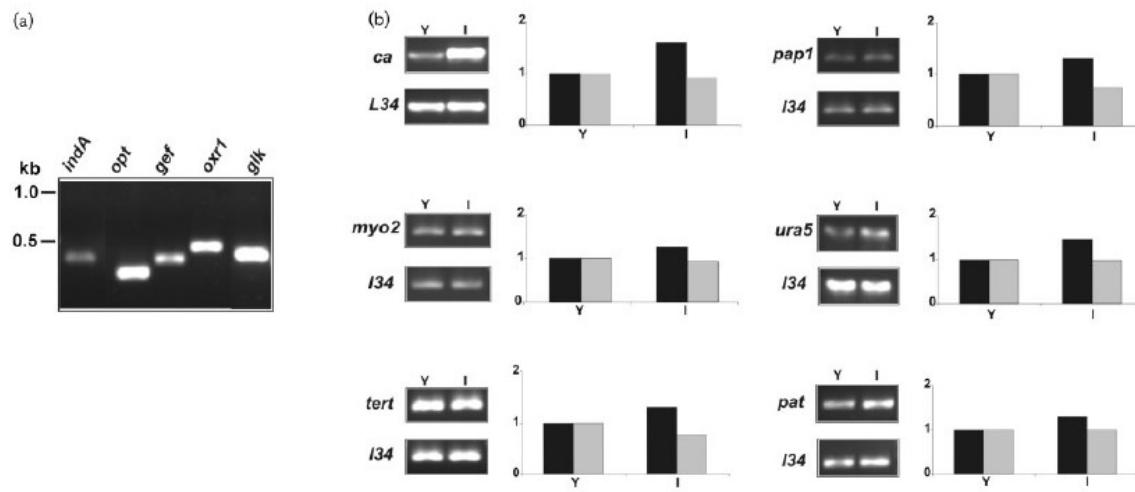


Figure 2: Validation of the cDNA library for the presence and analysis of redundancy of some transcripts. PCR and sqRT-PCR analysis were carried out with specific oligonucleotide primers, sense and antisense, respectively, as described in Table 1. A- PCR of total genomic DNA of *P. brasiliensis* with specific primers. B- sqRT-PCR of RNAs obtained from yeast cells recovered from infected mice. The sizes of the amplified products are described in Table 1.

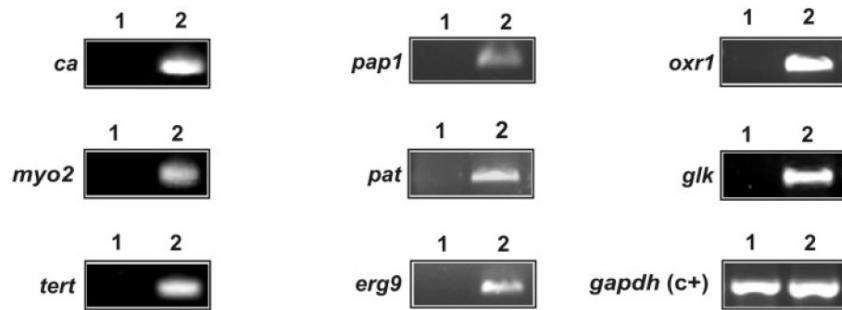


Figure 3- Transcripts analysis during the interaction of *P. brasiliensis* with Vero cells. sqRT-PCR analysis of selected transcripts in yeast cells in the *ex vivo* model of infection. The sizes of the amplified products are described in Table 1. The gene encoding GAPDH was used as an internal control for Vero cells.

VI - CONCLUSÕES:

O perfil de transcritos em células de *P. brasiliensis* recuperadas de animais infectados é requisito essencial para estudo do Genoma Funcional necessário para a elucidação de mecanismos de virulência fúngica e patogenicidade. Com o objetivo de analisar o perfil de *P. brasiliensis* durante a infecção, foi construída uma biblioteca de cDNA a partir de RNA extraído de fígado de camundongos infectados.

✓ Neste estudo foram seqüenciadas 4.934 ESTs no processo infectivo, estas seqüências foram agrupadas em 1.602 clusters, sendo que 1.041 eram contigs e 561 singlets. Destas seqüências, 1.750 ESTs (37,47% do total) foram de novos genes descritos para *P. brasiliensis* e 1.172 ESTs (23,75% do total) de genes super expressos nesta condição quando comparados com o banco de dados de células cultivadas *in vitro* (<https://dna.biomol.unb.br/Pb/>). A anotação funcional das 4.934 ESTs descritas neste estudo foi realizada através da comparação com bancos de dados do NCBI e classificadas quanto a sua possível função de acordo com o sistema MIPS. As categorias mais freqüentes encontradas foram metabolismo, com 12,87% das ESTs anotadas, transporte celular com 8,78% e energia com 8,55%.

✓ A super expressão de genes pertencentes à via glicolítica neste estudo reforça a hipótese de que em leveduras de *P. brasiliensis* o comportamento anaeróbio é exacerbado na mudança do metabolismo de carboidrato para produção de etanol, como já descrito no transcriptoma *in vitro* (<https://dna.biomol.unb.br/Pb/>).

✓ A super expressão de enzimas relacionadas ao metabolismo de lipídeos em células leveduriformes recuperadas de camundongos infectados confirma a idéia de que existe uma síntese ativa de lipídeos por estas células, sugerindo que a biossíntese de lipídeos esteja super regulada durante a infecção.

✓ Componentes da síntese/remodelação da membrana apresentam-se super expressos nas células recuperadas do processo infectivo. A descrição de um novo transcrito envolvido diretamente na via da biossíntese do esterol e a super expressão da ERG6 podem sugerir que a biossíntese do ergosterol esteja super regulada durante a infecção de *P. brasiliensis* em modelos experimentais.

✓ Nossas análises indicam que o Ciclo do Glioxalato parece estar super regulado nas leveduras após infecção no modelo experimental quando comparado com o transcriptoma *in vitro*, como demonstrado pela super expressão da enzima regulatória isocitrato liase 2 no presente transcriptoma.

✓ *P. brasiliensis* parece realizar a fosforilação oxidativa pelas vias clássicas no processo infectivo uma vez que os genes correspondentes aos complexos I a IV foram encontrados nesta condição experimental.

✓ A glutamina sintetase está super expressa nas células recuperadas de camundongos infectados com consequente produção de glutamina. A formação de glutamina tem função central no metabolismo do nitrogênio, além de atuar na biossíntese de nucleotídeos, aminoácido e uréia.

✓ Asparagina sintase é um novo transcrito identificado neste estudo. Análises da via de metabolismo de aminoácidos indicam que *P. brasiliensis* é capaz de sintetizar

asparagina durante o processo infectivo. Este achado ainda não havia sido descrito em *P. brasiliensis* no transcriptoma *in vitro* (<https://dna.biomol.unb.br/Pb/>).

- ✓ Durante o processo infectivo alguns transcritos possivelmente relacionados à virulência foram descritos. Com base nas funções de virulência de outros patógenos, foi possível inferir funções preditas de virulência para *P. brasiliensis*. A decarboxilase para aminoácido aromático (DDC), encontra-se abundante em células recuperadas de fígado de camundongos infectados reforçando a relevância da DOPA-melanina na infecção. A melanina provavelmente está implicada na patogênese protegendo o fungo contra a fagocitose e aumentando sua resistência a antifúngicos.
- ✓ Polyketide synthase, é um novo transcrito descrito neste estudo. A síntese primária de melanina ocorre via fenoloxidases e/ou via polyketide synthase. Sua descrição no presente estudo sugere que *P. brasiliensis* possa utilizar essa via na infecção.
- ✓ CAP 20 é um novo transcrito encontrado na condição experimental de infecção, cuja função predita foi descrita em *Colledotrichum gloeosporioides*. Mutantes incapazes de expressar CAP 20 diminuíram drasticamente sua virulência, sugerindo uma significante função deste gene na infecção do hospedeiro. Observa-se homologia entre as seqüências de proteínas da CAP 20 de *P. brasiliensis* e de *C. gloeosporioides*.
- ✓ O URA5 (Orotato fosforibosiltransferase) é um novo transcrito observado neste estudo. Em *Histoplasma capsulatum* foi construída uma linhagem deletada para este gene, mostrando que URA5 é essencial para a virulência do fungo.
- ✓ Outros prováveis fatores de virulência como indigoidina sintase, O^{VDP1} 92 (Proteína de resistência de oxidação), carnitina acetiltransferase e anidrase carbô

também foram descritos. O envolvimento destes genes na virulência de *P. brasiliensis* requer demonstração experimental apropriada.

✓ A análise do transcriptoma de *P. brasiliensis* no processo infectivo gerou várias informações sobre os eventos moleculares que ocorrem nesta condição. Estudos posteriores referentes aos novos genes, aos genes super expressos e aos possíveis genes relacionados à virulência são necessários e podem trazer um melhor esclarecimento sobre suas funções durante a infecção.

VII - PERSPECTIVAS:

93

O estudo de células de *P. brasiliensis* recuperadas de animais infectados fornecerá importantes informações para futuras pesquisas em estudos Funcionais através da análise de microarranjos, interferência por RNA e caracterização e expressão heteróloga dos genes

de interesse identificados. A interferência na expressão de genes específicos de *P. brasiliensis* induzidos durante a infecção, tornaria possível alterar-se a habilidade do fungo em adaptar-se a novas condições ambientais do hospedeiro. Com a identificação dos genes específicos ou super expressos do microrganismo, é possível a aplicação de novas abordagens para o desenvolvimento de novas drogas para prevenir e/ou tratar infecções causadas por *P. brasiliensis* e, possivelmente, outros fungos dimórficos.

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](#)