

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES  
MARCUS VINICIUS DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DO PERFIL TRANSCRICIONAL DE**  
***Paracoccidioides brasiliensis* EM RESPOSTA AO ESTRESSE**  
**OXIDATIVO**

Mogi das Cruzes, SP  
2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES  
MARCUS VINICIUS DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DO PERFIL TRANSCRICIONAL DE**  
***Paracoccidioides brasiliensis* EM RESPOSTA AO ESTRESSE**  
**OXIDATIVO**

Tese apresentada ao doutorado em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia

Área de Concentração: Biológica

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Nunes

Mogi das Cruzes, SP  
2009

FINANCIAMENTO: FAPESP, FAEP

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Oliveira, Marcus Vinicius de

Análise do perfil transcricional de *Paracoccidioides brasiliensis* em resposta ao estresse oxidativo / Marcus Vinicius de Oliveira. – 2009.

173 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2009

Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientador: Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. Luiz Roberto Nunes

1. *Paracoccidioides brasiliensis* 2. Microarranjo 3. PCR em tempo real 4. Quitina 5. Paraquat® I. Nunes, Luiz Roberto

CDD 579.5

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às catorze horas do dia dezesseis de fevereiro de dois mil e oito, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa da tese "ANÁLISE DO PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE *Paracoccidioides brasiliensis* EM RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO" para obtenção do grau de Doutor pelo(a) candidato(a) **Marcus Vinícius de Oliveira**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 78 (setenta e oito), a saber: 42 unidades de crédito em disciplinas e atividades na pós-graduação e 36 unidades de crédito no preparo da Tese, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Doutor. A Comissão Examinadora foi constituída pelos Senhores Professores Doutores Luiz Roberto Nunes, Welington Luiz de Araújo e Tiago Rodrigues da Universidade de Mogi das Cruzes, Gabriel Padilla da Universidade de São Paulo e João Lúcio de Azevedo da Universidade de São Paulo, sob a presidência do primeiro, como orientador do(a) aluno(a). A Sessão Pública da defesa da Tese foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral de seu trabalho, ao final da qual seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir, a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

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

Mogi das Cruzes, 16 de fevereiro de 2009

Comissão Examinadora

Julgamento

[Assinatura]  
Prof. Dr. Luiz Roberto Nunes

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

[Assinatura]  
Prof. Dr. Welington L. Araújo

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

[Assinatura]  
Prof. Dr. Tiago Rodrigues

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

[Assinatura]  
Prof. Dr. Gabriel Padilla

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

[Assinatura]  
Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

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

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, irmã e avós que sempre acreditaram na minha capacidade e me apoiaram em todos os momentos, tornando possível a realização deste nosso sonho.

Dedico também aos meus mestres, Luiz e Regina, que indicaram o caminho e com paciência ajudaram a trilhá-lo, apoiando meu crescimento, tornando-se referências à minha carreira acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Beatriz** por tudo.

À **Vivian** pela dedicação, contribuição, compreensão, puxões-de-orelha, idéias, ensinamentos, discussões, amadurecimento, companheirismo, enfim, pelo AMOR.

Ao **Edgar** e **Antônio** sempre presentes, apoiando e orientando minhas decisões.

Ao **Guilherme, Walter, Cida** e **Vó Ema** pela receptividade e compreensão nessa difícil jornada Santo André-Mogi-Santo André.

Aos meus padrinhos **Edson, Valdete** e **Walker** pelo interesse, apoio e motivação.

Ao **Neil** pelo exemplo de força de vontade, amor à vida e ao próximo.

Aos membros da banca de qualificação para conversão deste trabalho que se iniciou como dissertação de Mestrado e tornou-se uma tese de Doutorado, **Prof. Dr. Francisco G. Nóbrega** e **Prof. Dr. Fábio Henrique Kwasniewski**, e aos membros da banca de qualificação desta tese, **Prof. Dr. Tiago Rodrigues** e **Prof. Dr. Welington Luiz Araújo**, pelas observações e sugestões.

Ao **Prof. Dr. Francisco G. Nóbrega** e aos membros do seu laboratório no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UNIVAP em São José dos Campos, pelo apoio e material fornecido.

A **Prof. Dra. Rosana Puccia** e aos membros do seu laboratório no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo, pelo apoio e material fornecido.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Gênômica, onde desenvolvi este trabalho, **Maria Carolina, Ana Cláudia, Daiene, Deibs** e **Marina**.

As secretárias da pós-graduação e do NIB, **Renata** e **Neilce** pela colaboração durante a execução deste trabalho.

A FAEP e a FAPESP pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) é um fungo dimórfico e termorregulado associado ao desenvolvimento da paracoccidioidomicose (PCM), uma das mais prevalentes micoses sistêmicas granulomatosa que afeta moradores da América do Sul. Para avaliar mudanças no perfil de expressão gênica deste patógeno humano, em escala genômica, nosso grupo empreendeu a construção de um biochip detalhado de *P. brasiliensis*, contendo seqüências representativas de 4.692 genes deste microrganismo. Durante a monitoração da transição micélio-levedura induzida pela temperatura foi revelado um grande número de genes ligados à resposta ao estresse oxidativo, mostrando uma super expressão durante a diferenciação à fase parasita leveduriforme do fungo. Com o objetivo de investigar o padrão de expressão destes genes em *P. brasiliensis* fizemos análises de hibridação em microarranjos com amostras de RNA obtidas de células incubadas na presença de agentes geradores de espécies reativas de oxigênio (ROS), como Paraquat<sup>®</sup> (metil viologen) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Os padrões de expressão de vários genes (glicerol 3-fosfato desidrogenase, superóxido dismutase, histidina quinase) mostraram que o ataque oxidativo foi efetivo. Alguns genes como os de antioxidante tiol específico e peroxirredoxina mostraram subregulação, contrariando o esperado. O metabolismo de tirosina, que inclui a enzima 4HPPD, a produção de biotina e em especial, a via de síntese de quitina mostraram-se superexpressas e merecem ser investigadas como possíveis alvos terapêuticos no desenvolvimento de formas alternativas de tratamento contra a paracoccidioidomicose.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; microarranjo; PCR em tempo real; quitina; Paraquat<sup>®</sup>.



## ABSTRACT

*Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) is a dimorphic and thermoregulated fungus associated with the development of paracoccidioidomycosis (PCM), one of the most prevalent granulomatose systemic mycosis affecting residents of South America. To evaluate changes in gene expression profile of this human pathogen in a genomic scale, our group has undertaken the construction of a comprehensive *P. brasiliensis* biochip, carrying representative sequences from 4,692 genes from this microorganism. During temperature-induced mycelium-to-yeast dimorphic shift monitoring, a great number of oxidative stress-response genes displayed up-regulation at several time points of the differentiation into the yeast parasitic form of the fungus. To further investigate the expression pattern of these genes in *P. brasiliensis*, we conducted microarray hybridization analyses with RNA samples obtained from cells incubated in the presence of ROS-generating agents, such as Paraquat<sup>®</sup> (methyl viologen), and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). The expression pattern of several genes (glycerol 3-phosphate dehydrogenase, superoxide dismutase, histidine kinase) showed that the oxidative stress occurred. Some genes like thiol-specific antioxidant and peroxiredoxin, showed an unexpected down-regulation. The tyrosine pathway, that includes 4-HPPD enzyme, the biotin pathway and in particular the chitin synthesis, displayed up-regulation and must be investigated as potential targets for the development of alternative treatments against paracoccidioidomycosis.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*; microarray; q-PCR; chitin; Paraquat<sup>®</sup>.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Culturas do fungo dimórfico <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	16
Figura 02	Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose.....	18
Figura 03	Paracoccidioidomicose.....	21
Figura 04	Fotos de culturas de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> cultivadas em meio YPD líquido.....	26
Figura 05	Esquema de reações demonstrando o mecanismo de ação do Paraquat®.	38
Figura 06	Arquitetura do “chip” de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	40
Figura 07	Metodologia de hibridação em microarranjos de DNA.....	41
Figura 08	Curvas de crescimento do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> na presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	53
Figura 09	Representação de 740 genes modulados na presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	55
Figura 10	Figura de mérito dos genes modulados na presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	56
Figura 11	Agrupamento em 56 “clusters” dos genes modulados na presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	57
Figura 12	“Cluster” 05.....	58
Figura 13	“Cluster” 09.....	59
Figura 14	“Cluster” 52.....	60
Figura 15	“Cluster” 13.....	61
Figura 16	“Cluster” 34.....	62
Figura 17	“Cluster” 37.....	62
Figura 18	Comparação dos dados obtidos nas hibridações em microarranjos de DNA por qPCR para o tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	63-64
Figura 19	Correlação entre os dados obtidos nas hibridações em microarranjos de DNA por qPCR para o tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	65
Figura 20	Curvas de crescimento do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> na presença de Paraquat® .....	66
Figura 21	Representação de 2070 genes modulados na presença de Paraquat® .....	68
Figura 22	Figura de mérito dos genes modulados na presença de Paraquat® .....	69

Figura 23	Agrupamento em 70 “clusters” dos genes modulados na presença de Paraquat <sup>®</sup> .....	70
Figura 24	“Cluster” 02.....	71
Figura 25	“Cluster” 62.....	72
Figura 26	“Cluster” 35.....	73
Figura 27	“Cluster” 21.....	74
Figura 28	“Cluster” 43.....	75
Figura 29	“Cluster” 13.....	76
Figura 30	“Cluster” 42.....	77
Figura 31	“Cluster” 60.....	77
Figura 32	Comparação dos dados obtidos nas hibridações em microarranjos de DNA por qPCR para o tratamento com Paraquat <sup>®</sup> .....	78-79
Figura 33	Correlação entre os dados obtidos nas hibridações em microarranjos de DNA por qPCR para o tratamento com Paraquat <sup>®</sup> .....	80
Figura 34	Diagrama de Venn.....	81
Figura 35	Agrupamento em 64 “clusters” dos genes modulados em resposta a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e Paraquat <sup>®</sup> .....	82
Figura 36	“Cluster” 09.....	83
Figura 37	“Cluster” 22.....	84
Figura 38	“Cluster” 33.....	85
Figura 39	“Cluster” 41.....	85
Figura 40	“Cluster” 44.....	86
Figura 41	“Cluster” 46.....	87
Figura 42	Agrupamento em 64 “clusters” dos genes modulados em resposta a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e GSNO.....	88
Figura 43	“Cluster” 16.....	89
Figura 44	“Cluster” 36.....	89
Figura 45	“Cluster” 41.....	90
Figura 46	“Cluster” 54.....	90
Figura 47	“Cluster” 57.....	91

Figura 48	“Cluster” 60.....	91
Figura 49	Agrupamento em 72 “clusters” dos genes modulados em resposta a Paraquat® e GSNO.....	92
Figura 50	“Clusters” 1 e 35.....	93
Figura 51	“Clusters” 17 e 52.....	93
Figura 52	“Cluster” 09.....	94
Figura 53	“Cluster” 14.....	94
Figura 54	“Cluster” 18.....	95
Figura 55	“Cluster” 19.....	95
Figura 56	“Cluster” 49.....	96
Figura 57	“Cluster” 59.....	96
Figura 58	Agrupamento em 64 “clusters” dos genes modulados em resposta a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Paraquat® e GSNO.....	97
Figura 59	“Clusters” 16 e 59.....	98
Figura 60	“Clusters” 32 e 61.....	98
Figura 61	“Cluster” 10.....	99
Figura 62	“Cluster” 20.....	99
Figura 63	“Cluster” 43.....	100
Figura 64	“Cluster” 54.....	100
Figura 65	“Cluster” 56.....	101
Figura 66	“Cluster” 60.....	101
Figura 67	Representação das vias de glicólise, gliconeogênese, pentose-fosfato, fermentação alcoólica e ciclo do ácido cítrico.....	114
Figura 68	Fosforilação oxidativa.....	123
Figura 69	Metabolismo de tirosina e fenilacetato.....	124
Figura 70	Via de degradação de cisteína.....	126
Figura 71	Via de síntese de quitina.....	130

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 4HPPD:** 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase
- ADGP:** 2-amino-2-deoxi-D-glucitol-6-fosfato
- ADMP:** 2-amino-2-deoxi-D-manitol-6-fosfato
- ADP:** adenosina difosfato
- AIDS:** síndrome da imunodeficiência adquirida
- AMPc:** adenosina monofosfato cíclica
- ANOVA:** análise de variância
- ATP:** adenosina trifosfato
- BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool (Ferramenta de busca e alinhamento local)
- BSO:** butionina sulfoxamina
- Ca:** cálcio
- cDNA:** DNA complementar
- CID:** Contraimuno eletroforese
- CO<sub>2</sub>:** gás carbônico
- CoA:** Coenzima A
- Cu:** cobre
- Cy3:** cianina 3
- Cy3-dCTP:** cianina 3 ligada à 2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
- Cy5:** Cianina 5
- Cy5-dCTP:** cianina 5 ligada à 2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
- dATP:** 2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
- dCTP:** 2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
- dGTP:** 2'-desoxiguanidina 5'-trifosfato
- DMPO:** dimetil pirroli-N-óxido
- DNA:** ácido desoxirribonucléico
- dNTPs:** desoxinucleotídeos trifosfatados
- DO:** densidade óptica
- DOPA:** diidroxifenilalanina
- DTT:** ditiotreitól

**dTTP:** 2'-desoxitimidina 5'-trifosfato  
**ELISA:** ensaio de adsorção imunoenzimática  
**ERN:** espécie reativa de nitrogênio  
**ERO:** espécie reativa de oxigênio  
**EST:** fragmentos de seqüências expressas  
**FAD:** flavina adenina dinucleotídeo  
**FADH<sub>2</sub>:** FAD reduzido  
**Fe:** ferro  
**FMDP:** ácido N<sup>3</sup>-(4-metoxifumaroil)-L-2,3-diaminopropanoico  
**FMN:** flavina mononucleotídeo  
**FMNH<sub>2</sub>:** FMN reduzido  
**FOM:** figura de mérito  
**g:** força gravitacional  
**G3PDH:** gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase  
**G6PDH:** glicose 6-fosfato desidrogenase  
**gp:** glicoproteína  
**GSH:** glutathiona reduzida  
**GSNO:** S-nitroso glutathiona  
**h:** hora  
**H<sub>2</sub>O:** água  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrogênio  
**HO·:** radical hidroxil  
**HOCl:** ácido hipocloroso  
**HSP:** proteína de choque térmico  
**IB:** imunoblot  
**ICL:** isocitrato liase  
**ID:** Imunodifusão dupla  
**IFI:** Imunofluorescência indireta  
**IL:** interleucina  
**INF-γ:** interferon gama  
**kDa:** kilo Dalton  
**LPS:** lipopolissacarídeos  
**M:** “mycelial” ou micélio  
**MAC:** número de acesso (microarranjo *contig*)

**MAPK:** proteína quinase ativadora de mitose  
**MAS:** número de acesso (microarranjo *singlet*)  
**Mb:** megabases  
**MEV:** *multi experiment viewer*  
**MDR:** resistência à multidrogas  
**mg:** miligrama  
**mL:** mililitro  
**MLS:** malato sintase  
**mM:** milimolar  
**Mn:** manganês  
**mRNA:** RNA mensageiro  
**NaCl:** cloreto de sódio  
**NAD:** nicotinamida adenina dinucleotídeo  
**NADH:** NAD reduzido  
**NADP:** nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
**NADPH:** NADP reduzido  
**NCBI:** *National Center for Biotechnology Information*  
**ng:** nanograma  
**Ni:** níquel  
**nm:** nanômetro  
**nM:** nanomolar  
**nmol:** nanomol  
**NO:** óxido nítrico  
**NTBC:** 2-(2-nitro-4-trimetilbenzoil)-1,3-ciclohexanodiona  
**O<sub>2</sub>:** oxigênio  
**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:** radical superóxido  
**O<sub>3</sub>:** ozônio  
**PAS:** ácido periódico de Schiff  
**Pb:** *Paracoccidioides brasiliensis*  
**PCM:** paracoccidiodomicose  
**PCR:** reação de polimerização em cadeia  
**PEPCK:** fosfo-enolpiruvato carboxiquinase  
**pH:** potencial hidrogeniônico  
**Pi:** fosfato inorgânico

**Pkc**: proteína quinase c

**pmol**: picomol

**PQ**: Paraquat<sup>®</sup>

**Q**: coenzima Q ou ubiquinona

**QH<sub>2</sub>**: ubiquinol

**qPCR**: PCR quantitativo em tempo real

**q.s.p.**: quantidade suficiente para

**RAPD**: amplificação randômica de DNA polimórfico

**RNA**: ácido ribonucléico

**RNase**: enzima que digere o RNA

**rRNA**: RNA ribossomal

**rpm**: rotações por minuto

**RT-PCR**: transcriptase reversa - reação de polimerização em cadeia

**s**: segundo

**S**: enxofre

**SDS**: dodecil sulfato de sódio

**SOD**: superóxido dismutase

**SSADH**: succinato semialdeído desidrogenase

**SSC**: solução de citrato de sódio e cloreto de sódio

**Tau-Cl**: taurina cloramina

**TNF- $\alpha$** : fator alfa de necrose tumoral

**TRX**: gene de tiorredoxina

**TSU**: trimetoprim sulfametoxazol

**U**: unidade

**UDP**: uracila difosfato

**Y**: *yeast* ou levedura

**YPD**: meio de cultura contendo extrato de levedura, peptona caseína e dextrose

**Zn**: zinco

**$\lambda$ Q**: bacteriófago  $\lambda$ Q

**$\mu$ g**: micrograma

**$\mu$ L**: microlitro

**$\mu$ m**: micrômetro

**$\mu$ M**: micromolar



# SUMÁRIO

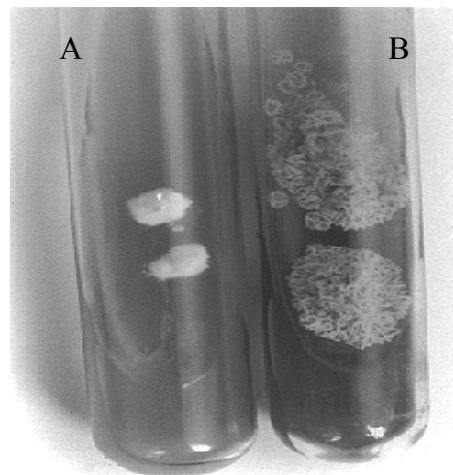
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	16
1.2 PARACOCCIDIODOMICOSE (PCM).....	17
1.3 <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	25
1.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA PARACOCCIDIODOMICOSE.....	31
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO.....	34
1.5.1 Paraquat®.....	37
1.6 HIBRIDAÇÃO EM MICROARRANJOS DE DNA.....	39
1.7 RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL(qPCR).....	42
2. OBJETIVOS.....	44
2.1 OBJETIVO GERAL.....	44
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
3. MÉTODO.....	45
3.1 CULTIVO DE <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	45
3.2 CURVA DE CRESCIMENTO NA PRESENÇA DOS AGENTES OXIDANTES.....	45
3.3 EXPOSIÇÃO AO H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	46
3.4 EXPOSIÇÃO AO PARAQUAT®.....	46
3.5 EXTRAÇÃO DE RNA.....	46
3.6 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA DO RNA E MARCAÇÃO FLUORESCENTE DA SEGUNDA FITA DE cDNA.....	47
3.7 HIBRIDAÇÃO DOS MICROCHIPS.....	48
3.8 AQUISIÇÃO E ANÁLISE DE IMAGENS.....	49
3.9 RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qPCR).....	51
3.10 ANÁLISE DAS RELAÇÕES ENTRE OS CONJUNTOS DE GENES MODULADOS EM RESPOSTA AOS GERADORES DE RADICAIS LIVRES.....	52
4. RESULTADOS.....	53
4.1 RESPOSTA DE <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> AO TRATAMENTO COM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	53
4.1.1 Crescimento do fungo na presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	53
4.1.2 Hibridação em microarranjos de DNA.....	54
4.1.3 Agrupamento dos genes pelo perfil de expressão.....	56

4.1.4	Comparação dos resultados de hibridação por qPCR.....	62
4.2	RESPOSTA DE <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> AO TRATAMENTO COM PARAQUAT <sup>®</sup> .....	65
4.2.1	Crescimento do fungo na presença de Paraquat <sup>®</sup> .....	65
4.2.2	Hibridação em microarranjos de DNA.....	67
4.2.3	Agrupamento dos genes pelo perfil de expressão.....	69
4.2.4	Confirmação dos resultados de hibridação por qPCR.....	77
4.3	RELAÇÕES ENTRE OS CONJUNTOS DE GENES MODULADOS EM RESPOSTA A CADA TRATAMENTO GERADOR DE RADICAIS LIVRES.....	81
4.3.1	Agrupamento de genes Modulados em resposta a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e Paraquat <sup>®</sup> .....	82
4.3.2	Agrupamento de genes modulados em resposta a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e GSNO.....	87
4.3.3	Agrupamento de genes modulados em resposta a Paraquat <sup>®</sup> e GSNO...	91
4.3.4	Agrupamento de genes modulados em resposta a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Paraquat <sup>®</sup> e GSNO.....	97
5.	DISCUSSÃO.....	102
5.1	GENES DE <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> MODULADOS EM RESPOSTA A H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	105
5.2	GENES DE <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> MODULADOS EM RESPOSTA A PARAQUAT <sup>®</sup> .....	109
5.3	VIAS METABÓLICAS EM <i>P. brasiliensis</i> .....	113
5.3.1	Metabolismo de carboidratos.....	113
5.3.2	Metabolismo energético.....	121
5.3.3	Metabolismo de aminoácidos.....	123
5.3.4	Outros genes relevantes.....	127
6.	CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	133
	REFERÊNCIAS.....	134
	ANEXOS.....	169
A	– PRIMERS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE qPCR.....	170
B	– MEIO DE CULTURA YPD.....	171
Meio líquido.....		171
Meio sólido.....		171
C	– SOLUÇÃO DE HIBRIDAÇÃO.....	172
D	– SOLUÇÕES DE LAVAGEM DA HIBRIDAÇÃO.....	173
Solução de média estringência.....		173
Solução de alta estringência.....		173
Solução de pós-lavagem.....		173
SSC.....		173

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Das inúmeras espécies de fungos atualmente descritas, uma pequena parcela é patogênica, e destes a maioria tem a capacidade de apresentar-se de duas formas diferentes (micélio e levedura), dependendo das condições a que são submetidos (ROONEY e KLEIN, 2002). Nesse caso são chamados de dimórficos (Figura 01). O dimorfismo fúngico é definido então, como a interconversão reversível, controlada por fatores ambientais, das morfologias de micélio filamentoso e levedura unicelular, sem que esta seja essencial para ciclo de vida do organismo. Vários fatores ambientais têm sido associados à interconversão tais como, temperatura, pH, níveis de glicose, dióxido de carbono, fonte de nitrogênio, presença de metais de transição e agentes quelantes (HORNBY *et al.*, 2004).



**Figura 01:** Culturas do fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. A – forma de micélio, cultivada à temperatura de 25 °C. B – forma de levedura, cultivada a 37 °C. (Fonte: LACAZ *et al.*, 1999)

A incidência de infecções fúngicas sistêmicas tem crescido nos últimos anos em pacientes saudáveis e imunocomprometidos, tornando os fungos patogênicos dimórficos um importante campo de pesquisa médica (TAVARES *et al.*, 2005). A maior parte destas infecções sistêmicas é causada por fungos como *Candida albicans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Coccidioides spp* (MARESCA e KOBAYASHI, 1989; ROONEY e KLEIN, 2002). Nestas espécies, a transição morfológica é causada por mudanças na temperatura, sendo no meio ambiente (23-25° C), a forma representativa o micélio filamentoso que, após infectar o hospedeiro (37° C), é convertido à

sua fase leveduriforme, com exceção da *Candida albicans* em que a transição ocorre de forma inversa (ROONEY e KLEIN, 2002). Esse fenômeno tem se mostrado intimamente relacionado com a patogenicidade destes fungos, uma vez que cepas de *P. brasiliensis*, *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* incapazes de se converterem em leveduras não são virulentas (MEDOFF *et al.*, 1986; SAN-BLAS e NIÑO-VEGA, 2001).

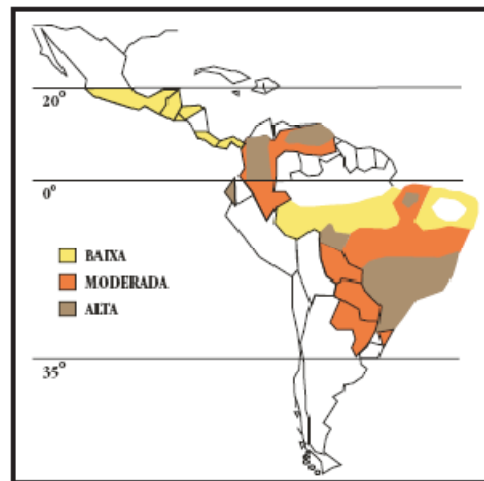
Em alguns fungos dimórficos, como o *P. brasiliensis*, a reprodução sexuada não foi descrita. A reprodução assexuada pode ser realizada por brotamentos na fase leveduriforme ou pela produção de conídios, modo mais comum de reprodução assexuada na fase micelial. Estas estruturas são produzidas pela transformação do sistema vegetativo do próprio micélio. Conídios ou fragmentos de micélio filamentosos, dispersos no ar por perturbações no solo ou excretas de animais, são formas primárias de infecção, que podem ser inaladas pelo hospedeiro. Após inalação, as células rapidamente se convertem em sua forma leveduriforme. Assim, a infecção pode resultar em uma micose pulmonar, a qual pode se tornar auto-limitante ou disseminar-se por outros órgãos podendo levar à morte. A exceção é o *S. schenckii*, que usualmente infecta por inoculação direta na pele, causando doença monocusitária ou linfática após conversão para levedura, apesar de alguns casos pulmonares terem sido reportados (ROONEY e KLEIN, 2002; HORNBY *et al.*, 2004).

As micoses sistêmicas apresentam uma série de características comuns e seus agentes etiológicos são encontrados nos solos ou em dejetos de animais, sendo as vias aéreas superiores a sua principal porta de entrada no organismo do hospedeiro vertebrado. O clima, características do solo e a presença de certos animais são fatores que também parecem influenciar a distribuição geográfica destes fungos (TABORDA *et al.*, 1998). No caso de uma infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*, esta micose é chamada de paracoccidioidomicose.

## 1.2 PARACOCCIDIOIDOMICOSE (PCM)

A paracoccidioidomicose, também conhecida como blastomicose sul-americana ou doença de Lutz-Splendore-Almeida é uma das mais importantes micoses sistêmicas. A doença é granulomatosa, possui marcada expressão cutâneo-mucosa, pulmonar, relevante participação linfática e ganglionar, localização supra-renal, óssea, visceral e cerebral. A evolução é crônica, progressiva, grave, com tendência para a generalização e freqüentemente fatal. Foi descoberta no Brasil, por Lutz, em 1908, e Splendore estudou-a entre 1910 e 1912 (ESTEVEZ, CABRITA e NOBRE 1990; ARISTIZABAL *et al.*, 1998; TRABULSI *et al.*, 1999; SAN-BLAS e NINO-VEGA, 2001).

Uma das características mais importantes da paracoccidioidomicose é a sua distribuição geográfica, restrita à América Latina, do México à Argentina. No entanto não ocorre em todos os países dentro destes limites como pode ser visto na **figura 02**. O Brasil apresenta 80 % dos casos, seguido por Colômbia e Venezuela. Exceto por um caso em Trinidad (JANKEY, RAJU e BARROW, 1987), a micose não tem sido relatada nas Ilhas Caribenhas, Guiana, Suriname, ou Chile. Na América central, já foi relatada em todos os países, exceto Belize e Nicarágua. Constitui-se na principal micose sistêmica da América Latina, sendo classificada como a primeira causa de morte entre as micoses sistêmicas, e a oitava, quando consideradas as doenças infecciosas e parasitárias (RESTREPO, 1985; CASOTO, 1990; ANDRADE *et al.*, 2005; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).



**Figura 02:** Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose. (Fonte: SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

Nos países onde a doença é endêmica a distribuição dos casos não é homogênea em seus territórios, concentrando-se ao redor das florestas úmidas (tropicais e subtropicais) (RESTREPO, 1985). Estima-se que nas regiões endêmicas, em que vivem aproximadamente 90 milhões de pessoas, 10 milhões podem estar infectadas por este fungo e mais de 2 % destes podem vir a desenvolver a doença. Apesar do contato com o fungo, acredita-se que, apenas esta minoria irá desenvolver a doença, pois a evolução da infecção está intimamente relacionada com a imunidade do paciente (TRABULSI *et al.*, 1999; NASCIMENTO *et al.*, 2002; BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002). Nos casos reportados fora destas regiões, os pacientes viveram ou visitaram tais locais e, na maioria destes casos, os períodos de latência, entre a saída da região endêmica e as manifestações clínicas, foram prolongados (em média 15 anos) (AJELLO e POLONELLI, 1985; BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993; RESTREPO, McEWEN e CASTAÑEDA, 2001). No Brasil foram registrados 3.181 casos de

óbitos por paracoccidiodomicose entre os anos de 1980 e 1995, resultando em uma taxa de mortalidade de 1,45 casos por milhão de habitantes (COUTINHO *et al.*, 2002).

Com base em estudos com animais, foi possível entender como se inicia a infecção em seres humanos. Inicialmente os conídios ou propágulos fúngicos, unidades reprodutivas produzidas por fungos na fase de reprodução assexual são inalados, atingindo o epitélio pulmonar, onde se transformarão em leveduras, que crescerão no parênquima pulmonar, produzindo uma doença progressiva que pode disseminar-se para outros órgãos. Em hospedeiros imunocompetentes, geralmente, o crescimento do fungo é rechaçado e ocorre a cura espontânea, sem danos (infecção sub-clínica). Entretanto, quando o paciente está imunologicamente comprometido, a infecção avança levando à doença completamente desenvolvida (McEWEN *et al.*, 1987a).

A paracoccidiodomicose é pouco observada em crianças e jovens (10 %), sendo seu diagnóstico mais comum em indivíduos adultos de 30 a 60 anos, de raça branca (LACAZ *et al.*, 2002). Quanto ao sexo, é muito mais freqüente em homens, ocorrendo nas áreas endêmicas numa proporção de 13:1. Em países como Colômbia, Equador e Argentina, a razão chega a 150:1. No entanto, o teste de reação intradérmica com paracoccidiodina [antígeno preparado por filtração de amostras de *P. brasiliensis* mantidas em meio líquido por três meses à temperatura de 24-28° C – (LACAZ *et al.*, 2002)] mostrou-se positivo, sem diferenças entre os sexos, sugerindo que, embora a infecção sub-clínica seja adquirida por ambos os sexos, a progressão da doença é mais acentuada em homens (BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993).

Estudos *in vitro* indicaram que o hormônio feminino estradiol inibe a transição de micélio para levedura em *Paracoccidioides brasiliensis* (RESTREPO *et al.*, 1984). Estudos *in vivo* também comprovaram a influência hormonal nesta micose mostrando que em fêmeas de camundongos susceptíveis, a transição micélio-levedura não ocorreu e a infecção foi contida, ao contrário do observado em machos, corroborando a idéia de que o dimorfismo está diretamente relacionado à virulência e explicando estas discrepâncias na epidemiologia. Também foi observado que estrogênios, como o estradiol, estimulam fortemente a atividade de macrófagos, e há uma predominância de macrófagos em fêmeas infectadas com *P. brasiliensis*. Já nos machos infectados a maioria das células encontradas foi neutrófilos polimorfonucleares o que demonstra que os macrófagos devem induzir uma resposta mais eficiente contra este patógeno (ARISTIZABAL *et al.*, 1998).

Outro fator verificado por Lacerda e Arce-Gomez (1983) e Lacerda, Arce-Gomes e Telles Filho (1988) mostra que certas pessoas apresentaram possibilidades 3 a 4 vezes

maiores de adquirir a infecção. Essa maior susceptibilidade está relacionada à ausência do antígeno HLA-B40, comprovando que fatores de defesa natural do hospedeiro influenciam no prognóstico da infecção. Assim, outros fatores como baixo nível sócio-econômico, grau de desnutrição e os hábitos individuais que podem influenciar na defesa natural dos portadores da doença devem ser considerados.

Existem duas formas clínicas distintas reconhecidas: a forma juvenil, aguda ou subaguda, e a forma crônica adulta, ambas associadas a muitas seqüelas, incluindo principalmente, lesões pulmonares (Figura 03A). Testes da função respiratória revelaram que os danos pulmonares são na maioria das vezes do tipo obstrutivo. A forma juvenil aguda ou subaguda representa apenas de 3 a 5 % dos casos; seu curso é rápido (semanas ou meses), é a forma mais severa e com pior prognóstico, podendo levar a septicemia, culminando com a morte do paciente. O sistema imune celular fica comprometido enquanto que a imunidade humoral é estimulada, apresentando um aumento na produção de anticorpos específicos (CANO *et al.*, 1995). Em alguns casos o hospedeiro apresenta uma forma de infecção leve e localizada com uma resposta imune celular normal e níveis de anticorpos normais, apresentando granulomas compactos com poucos fungos ou ausentes (LACAZ *et al.*, 2002). Na maior parte dos casos pode manifestar-se de forma mais grave e intensa, havendo disseminação para órgãos e tecidos como fígado, baço, pulmão e medula óssea com a formação de granulomas frouxos com grande número de fungos, levando a hipertrofia de alguns órgãos. Esses diferentes tipos de manifestação dependem de fatores relacionados à interação parasito-hospedeiro (CALICH *et al.*, 1985; BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993).

A forma adulta ou crônica atinge mais de 90 % dos casos, sendo normalmente pacientes adultos homens; a doença progride lentamente, demorando meses ou mesmo anos para se estabelecer completamente. As manifestações pulmonares são evidentes em 90 % dos pacientes (Figura 03A), sendo que em 25 % destes, o sistema respiratório é o único afetado (doença unifocal). No restante dos casos, o acometimento pode ser sistêmico (multifocal). Além dos pulmões, mucosas, oral e nasal, e pele são freqüentemente atingidas, formando vesículas ou pápulas que ulceram e formam pontos hemorrágicos bastante evidentes (Figura 03B). Há semelhanças com a tuberculose com a qual coexiste em 10 % dos casos (BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993; CANO *et al.*, 1998a; BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002; QUAGLIATO *et al.*, 2007).



**Figura 03:** Paracoccidioidomicose. A: radiografia pulmonar de um paciente com PCM (a seta amarela indica a região pulmonar afetada). B - lesões na pele e mucosas associadas à PCM. (Fontes: A – Adaptado de QUAGLIATO *et al.*, 2007 e B – SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006)

A evolução e a gravidade da doença variam largamente entre os pacientes e, as várias formas clínicas observadas estão relacionadas aos diferentes níveis de resposta imune do hospedeiro. Os pacientes portadores da forma aguda severa da doença freqüentemente apresentam depressão da resposta imune celular, diminuição da reatividade a testes cutâneos e altos níveis de anticorpos contra o *P. brasiliensis*. Nestes pacientes, a resposta tecidual é caracterizada pela ocorrência de granulomas frouxos que abrigam um grande número de fungos. Em indivíduos com as formas localizadas da doença, por outro lado, observam-se respostas positivas para provas de hipersensibilidade, baixos níveis de anticorpos específicos e a formação de granulomas compactos com poucos fungos (ANDRADE *et al.*, 2005; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

A paracoccidioidomicose é freqüentemente relatada como uma doença oportunista, sendo reativada, ou apresentando sinais clínicos pela primeira vez, em pacientes submetidos a alguma forma de imunossupressão. Existem relatos da micose em pacientes imunodeprimidos após transplante renal (SUGAR, RESTREPO e STEVENS, 1984; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1995; ZAVASCKI, BIENARDT e SEVERO, 2004). No primeiro caso relatado por Sugar, Restrepo e Stevens (1984), o paciente foi submetido a tratamento com um imunossupressor de 1969 até 1980, quando foi constatada clinicamente a doença. O interessante é que o último contato do paciente com uma área endêmica foi em 1941, ou seja, 39 anos antes do diagnóstico clínico. Em um caso mais recente, relatado por Zavascki, Bienardt e Severo (2004) o paciente, submetido ao mesmo imunossupressor, apresentou a doença 14 anos após ter recebido o transplante, sendo que seu último contato com a área endêmica 26 anos antes do aparecimento da micose. Alguns casos de PCM foram também relatados em pacientes imunodeprimidos por tratamento quimioterápico contra câncer, os mais comuns são em localizações como pulmões, orofaringe e laringe, mais raramente, porém também relatados,



estão as neoplasias da série hematológica, como leucemia e linfoma (SEVERO *et al.*, 1979; BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993; ZAVASCKI, BIENARDT e SEVERO, 2004; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

Em relação à pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), a incidência de PCM é relativamente baixa, no entanto o prognóstico é ruim. Acredita-se que esse baixo número de casos se deva a dois motivos: o aumento no uso de trimetoprimisulfametoxazol (TSU) como profilaxia para a pneumonia causada por *Pneumocystis carinii*, que inibiria também o *Paracoccidioides brasiliensis* e o fato da AIDS ter uma maior incidência em áreas urbanas, enquanto a PCM é mais comum em áreas rurais. Com a expansão da AIDS nas áreas rurais, espera-se um aumento nos casos de associações entre as doenças (BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993; NOBRE *et al.*, 2003).

O diagnóstico definitivo da PCM é dado pelo isolamento e identificação do fungo por exame micológico direto, mais barato e simples, obtido de lesões cutâneas ou mucosas, aspirados de nódulos linfáticos, abscessos ou fluido sinovial. Também podem ser feitos exames histopatológicos, citopatológicos, citológico após biópsia ou cultura e por meio de técnicas sorológicas (MARQUES, 1998). Brotamentos polares ou multipolares são observados no exame direto ou histopatológico. Os brotamentos múltiplos ou multipolares conferem ao fungo a aparência de “roda de leme”, característica de *Paracoccidioides brasiliensis* (CANO *et al.*, 1998b; RAMOS-e-SILVA e SARAIVA, 2008). Várias técnicas de coloração podem ser empregadas tais como Perdrau, Gomori-Grocott, Gridley, PAS, hematoxilina-eosina e hematoxilina férrica (LACAZ *et al.*, 2002).

Exames sorológicos são indicados durante e após o tratamento para avaliar o prognóstico e a atividade da doença. Imunodifusão dupla (ID), contraímunoelctroforese (CIE), imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunoblot (IB) são métodos disponíveis em diferentes serviços de referência (MARQUES da SILVA *et al.*, 2006; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; RAMOS-e-SILVA e SARAIVA, 2008). Estes métodos utilizam como substrato antigênico uma glicoproteína de 43 kDa, gp-43, considerada específica para o *P. brasiliensis* (PUCCIA *et al.*, 1986). Este antígeno pode ser detectado no soro e na urina de pacientes com PCM (CAMARGO *et al.*, 1994; de ALMEIDA, 2005). Outra glicoproteína que pode ser utilizada como componente antigênico é a gp-70 (MARQUES da SILVA e CAMARGO, 2005).

Na técnica de ELISA são utilizados anticorpos monoclonais para gp-43, um método rápido e apropriado para exame de grande número de soros, apesar de altamente sensível tem uma especificidade menor do que a ID, por exemplo (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006),

estudos mostram reações cruzadas em testes utilizando soro de pacientes com histoplasmose e aspergilose (de ALMEIDA, 2005). Também podem ser observadas reações intradérmicas com o anticorpo paracoccidioidina (tipo I, II e III) (LACAZ *et al.*, 2002).

A técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) é promissora para a rotina de diagnóstico da PCM devido a sua alta sensibilidade e especificidade. Isto será possível a partir da descrição de várias seqüências de DNA de *P. brasiliensis* com potencial diagnóstico (MARQUES, 2003; RAMOS-e-SILVA e SARAIVA, 2008). A detecção de microsátélites no DNA de *P. brasiliensis* também pode auxiliar no diagnóstico, diferenciando cepas desde altamente patogênicas a não patogênicas, indicando possíveis prognósticos da doença (NASCIMENTO *et al.*, 2004).

Casos de falsos negativos nos testes sorológicos são predominantes na forma localizada da doença ou em casos de pacientes imunodeprimidos ou com AIDS. Falsos positivos ocorrem em soro de pacientes com histoplasmose ou aspergilose (do VALLE *et al.*, 2001).

No último consenso da doença a técnica de imunodifusão dupla foi considerada a principal para o diagnóstico da PCM, por causa da sua simplicidade, sensibilidade acima de 80% e especificidade maior que 90% (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). Uma mistura antigênica chamada Ag7 é utilizada, sendo composta por cerca de 90% de gp-43 (MARQUES, 1998). No entanto é pouco preditiva para a avaliação durante e após o tratamento (MARQUES, 2003). Sendo assim a titulação do soro é recomendada para a correta interpretação e avaliação da resposta terapêutica, uma vez que o título de anticorpos deve cair com o controle da doença (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

A radiografia de tórax também auxilia no diagnóstico da PCM uma vez que a maior parte dos pacientes possui lesões pulmonares que reveladas por raios-X, apresentam-se nodulares, infiltrativas e fibróticas, freqüentemente bilaterais e preferencialmente localizadas na região central ou na porção inferior dos pulmões. O diagnóstico diferencial de tuberculose deve ser realizado pela coexistência das duas doenças (VALLE *et al.*, 1992; do VALLE *et al.*, 2001; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

O tratamento deve ser realizado de acordo com a forma clínica manifestada e o estado imunológico do paciente, sendo drogas sulfamídicas as mais comuns nos casos benignos ou localizados. Como exemplo de sulfamidas, é possível citar a sulfadiazina e a associação de sulfametoxazol com trimetoprima. Nos casos mais graves a droga recomendada é a anfotericina B; no entanto, devido a sua toxicidade, controles cuidadosos devem ser tomados durante o tratamento (dosagem de uréia, hemograma, eletrocardiograma, etc). Estas duas

drogas, apesar de eficientes, ainda apresentam alto grau de recidiva (aproximadamente 30%) (BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993; LACAZ *et al.*, 2002). Dillon e colaboradores (1986) verificaram que a associação de anfotericina B seguida a drogas sulfamídicas (como dose de manutenção) é mais eficiente que a monoterapia com a primeira droga. Como outras opções de tratamento aparecem os derivados de imidazol como o cetoconazol, itraconazol e fluconazol com alto grau de remissão da doença em casos leves e moderados. O voriconazol, um antifúngico triazólico de segunda geração, tem se mostrado eficaz para outras micoses, e parece promissor também para a PCM, segundo resultados baseados em dados clínicos, sorológicos e radiológicos (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; MARQUES, 2003). De uma forma geral o tratamento é realizado por um período prolongado, 1 a 2 anos, podendo em alguns casos durar mais que 5 anos, com recidivas e seqüelas freqüentes (CAMPOS *et al.*, 1984; BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993; MENDES-GIANNINI *et al.*, 1994; SHEEHAN, HITCHCOCK e SIBLEY, 1999).

Mesmo após tratamento adequado, com regressão da doença, esta pode deixar seqüelas que afetarão o bem-estar do paciente, sendo comum a fibrose do tecido afetado. As conseqüências mais comuns e incapacitantes ocorrem por lesões no pulmão. Dispneia e restrições cardiopulmonares são observadas em 60 a 80% dos pacientes (CAMPOS *et al.*, 1984). Devem ser feitos controles clínicos, micológicos e imunológicos semestralmente e, depois, anualmente. O teste intradérmico de paracoccidioidina feito antes e após o tratamento pode indicar uma boa resposta do paciente à medicação e bom prognóstico, embora ainda se fale de “cura aparente” da paracoccidioidomicose.

Além destas formas de tratamento vem sendo estudado o emprego da vacina contra a PCM. Em 1998, Tabora e colaboradores, isolaram os peptídeos P10 e inocularam em camundongos BALB/c, mediante certa dose infectante de *P. brasiliensis*, obtendo como resultado lesões ou granulomas com o fungo inviável. Em 2000, Pinto e colaboradores testaram uma vacina de DNA com o gene da gp-43 conseguindo imunização contra o *Paracoccidioides brasiliensis*. Em experimento de Marques e colaboradores (2006) foi verificado que a gp-43 e um peptídeo (P10) derivado desta glicoproteína possuem um efeito protetor. Acredita-se que o interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) produzido pelas células CD4 (T helper 1) seja o responsável por esse efeito. Uma vacina com a HSP 60 produziu resposta imunológica protetora em camundongos BALB/c com infecção pulmonar experimental de *P. brasiliensis* (de BASTOS ASCENÇO SOARES *et al.*, 2008)

### 1.3 *Paracoccidioides brasiliensis*

O *Paracoccidioides brasiliensis* é um organismo dimórfico que depende da temperatura de incubação como o único requerimento para a expressão da sua morfologia e patogenicidade. Inicialmente descrito por Splendore em 1912 com o nome de *Zymonema brasiliensis*, recebeu sua nomenclatura aceita atualmente em 1930 por F. P. Almeida (LACAZ *et al.*, 2002). Taxonomicamente é classificado como um microrganismo eucariótico do reino Fungi, filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, subclasse Eurotiomycetidae, ordem Onygenales, família Ajellomycetaceae, gênero *Paracoccidioides* e espécie *brasiliensis*. (INDEX FUNGORUM, 2008)

*In vitro* a 37° C e em tecidos infectados, o fungo sofre sua transição dimórfica e cresce em estágio leveduriforme (forma “L” ou “Y” de *yeast* – levedura em inglês), apresentam coloração creme e são unicelulares, com células esféricas ou ovais, bi ou multinucleadas (McEWEN *et al.*, 1987b), multiplicando-se por brotamento polar ou multipolar, conferindo-lhes a característica de “roda de leme” (Figura 04 A) (CANO *et al.*, 1998b). A fase micelial (forma “M” de micélio ou *mycelial* em inglês) cresce vagarosamente à temperatura ambiente (23 a 28° C) sob a forma de colônias brancas, pequenas, irregulares, cobertas por um curto micélio aéreo, aderentes à superfície do ágar, sendo esta a provável forma encontrada no ambiente. Ao microscópio ótico as hifas (multicelulares) são finas, septadas e apresentam estruturas multinucleadas (Figura 04 B). Ambas necessitam de grandes quantidades de oxigênio para o crescimento, entretanto, leveduras jovens podem se adaptar a pequenas quantidades de oxigênio e entrar em um estágio de latência (McEWEN *et al.*, 1987b; BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993; CANO *et al.*, 1998b; BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002).



**Figura 04:** Fotos de culturas de *Paracoccidioides brasiliensis* cultivadas em meio YPD líquido (1 % de extrato de levedura, 2 % de peptona, 2 % de dextrose, pH 6,3). Em A cultura mantida a 37° C, apresentando-se em sua fase leveduriforme “Y”. Destacado em amarelo a “roda de leme”. Em B cultura mantida entre 25 e 27° C, apresentando-se em sua forma micelial “M”. Fotos do Autor.

Estudos realizados com 10 isolados diferentes de *P. brasiliensis* mostraram que o genoma deste fungo varia de aproximadamente 26,3 megabases (Mb) a 35,5 Mb em leveduras uninucleadas. Quando comparado ao conteúdo genômico de micélio a taxa de ploidia variou entre 1 e 1,1 nos diferentes isolados, mostrando não haver mudanças significativas no tamanho do genoma em relação à morfologia apresentada (ALMEIDA *et al.*, 2007). Todos os isolados deste estudo apresentaram-se haplóides, em contraste com alguns estudos anteriores que sugeriam um genoma diplóide para alguns isolados (CANO *et al.*, 1998b; MORAIS *et al.*, 2000; FEITOSA *et al.*, 2003)

O ciclo de vida e o habitat natural deste fungo ainda são desconhecidos (BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993). Acredita-se que o *P. brasiliensis* possa ser encontrado saprofiticamente na natureza onde, provavelmente, clamidósporos e conídios do fungo estejam presentes no solo ou em restos vegetais. Esta hipótese é apoiada pelo fato do fungo já ter sido isolado de forma esporádica em amostras de solo na Argentina (NEGRONI, 1966), Venezuela (de ALBORNOZ, 1971). No Brasil foi isolado em duas ocasiões: em Botucatu/SP (SANO *et al.*, 1997) e em Ibiá/MG (SILVA-VERGARA e MARTINEZ, 1998). Nos estudos epidemiológicos realizados em área rural endêmica (Ibiá/MG), indivíduos com antecedentes de contato com lavoura de café mostraram-se significativamente reativos à paracoccidioidina, sugerindo uma relação entre atividades de cultivo de café e transmissão de *P. brasiliensis* (SILVA-VERGARA e MARTINEZ, 1998). Porém, devido aos raros isolamentos de *P. brasiliensis* em amostras de solo, e que geralmente não são confirmadas em amostras

repetidas retiradas dos mesmos locais, alguns autores não aceitam que o solo seja o habitat permanente do fungo e sugerem que este patógeno resida apenas temporariamente e por um período variável nestes ambientes (DIAZ, 2007). Este fungo já foi isolado nas fezes de alguns animais silvestres, como de morcegos frugívoros (*Artibeus lituratus*) (SOUTO, 2006) e pingüins (*Pygoscelis adeliae*) na região uruguaia da Antártida (GARCIA *et al.*, 1993). Foi também encontrado em vários tecidos de tatus (*Dasypus novemcinctus*), na região de Botucatu, (BAGAGLI *et al.*, 1998), no sul do Pará (NAIF *et al.*, 1986 e 1989), na Serra da Mesa, em Goiás (MACEDO, LACERA e TRILLES-REIS, 1998), na região mineira de Ibiá (SILVA-VERGARA *et al.*, 2000) e na Colômbia (CORREDOR *et al.*, 1999), sendo este animal o provável reservatório do fungo. No entanto, não se conhece a real importância desses animais no ciclo evolutivo do fungo. Em 2002 foi relatado o primeiro caso de PCM em cão de vida estritamente urbana (RICCI *et al.*, 2004). A característica das áreas endêmicas e dados laboratoriais sugerem que o microhabitat do fungo deve ser em ambientes úmidos (BRUMMER, CASTAÑEDA e RESTREPO, 1993; RESTREPO, McEWEN e CASTAÑEDA, 2001).

Muitos autores têm tentado, sem sucesso, correlacionar características de isolados de *P. brasiliensis* com sua virulência. A amplificação randômica de marcadores polimórficos de DNA (técnica de RAPD) foi utilizada para tentar estabelecer relações entre epidemiologia e filogenia de fungos isolados com diferentes graus de virulência e originários de regiões geográficas distintas. Os resultados apontaram uma grande variação genética com relação à origem geográfica dos isolados analisados, porém estes estudos não permitiram correlacionar a virulência dos isolados ou patologia da doença com os diferentes padrões genéticos verificados (CALCAGNO *et al.*, 1998; HAHN *et al.*, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2004).

Alguns genes responsáveis pela atividade de diversas enzimas que participam do metabolismo do fungo influenciam fortemente o grau de virulência deste. A principal via metabólica envolvida é o ciclo do glioxilato, que gera glicose (energia) a partir de compostos de dois carbonos. Esta via é um desvio do ciclo do ácido cítrico e é ativada na presença de duas enzimas: a isocitrato liase e a malato sintase. A isocitrato liase faz a clivagem do isocitrato em succinato e glioxato. O glioxato se condensa com a acetil-CoA, sendo esta reação catalisada pela malato sintase, formando como produto o malato (LEHNINGER *et al.*, 2000).

O ciclo do glioxilato não ocorre nos animais, e é de grande importância para o desenvolvimento de vários agentes patogênicos, constituindo, portanto um interessante alvo de estudos para o desenvolvimento de novas drogas. Patógenos como a *Candida albicans* e

*Mycobacterium tuberculosis* comprovaram a relação entre virulência e o ciclo do glioxalato, ou seja, após fagocitados foi induzida a expressão de genes relacionados às enzimas participantes desse ciclo (FINLAY e FALKOW, 1997; LORENZ e FINK, 2001; SCHNAPPINGER *et al.*, 2003). Em modelo murino de infecção, isolados mutantes de *C. albicans* para o gene isocitrato liase (ICL) (que codifica a enzima essencial para o ciclo do glioxilato) tiveram seu caráter virulento extremamente reduzido, fortificando a correlação entre a expressão desse gene e a virulência do fungo (GRAHAM e CLARK-CURTISS, 1999; LORENZ e FINK, 2001; SCHNAPPINGER *et al.*, 2003).

Em análises do transcriptoma de *P. brasiliensis* foram identificados genes ortólogos aos genes ICL 1 e malato sintase 1 (MLS) de *C. albicans*. Devido a esse fato, acredita-se que estes genes também exerçam influência na virulência do *P. brasiliensis*. Além disso, por ser um microorganismo intracelular facultativo, também deve usar esta via alternativa para geração de energia para a sua sobrevivência no interior dos fagócitos (FELIPE *et al.*, 2005).

A patogenicidade parece também estar ligada à transição dimórfica (M – Y), pois isolados que são incapazes de sofrer esta diferenciação não são virulentos. A transformação de hifas em células leveduriformes se inicia com o aumento do seu diâmetro na região interseptada e conseqüente rompimento da parede externa, a qual passa a permanecer em contato direto com o meio externo. Com este aumento, os espaços interseptais tendem a se separar, formando células isoladas e arredondadas, entre 5 e 25  $\mu\text{m}$  de diâmetro. A levedura de *P. brasiliensis* pode ligar-se a componentes da matriz extracelular, tais como fibronectina e colágeno. A adesão às células do hospedeiro e à superfície da mucosa é um passo fundamental no estabelecimento da infecção (McEWEN *et al.*, 1987a; ROONEY e KLEIN, 2002; NUNES *et al.*, 2005).

As vias de sinalização que controlam as mudanças morfológicas em *P. brasiliensis* ainda não estão bem esclarecidas, mas o envolvimento de vias de transdução de sinais de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) e “mitogen activated protein kinase” (MAPK) têm sido relatado em diferentes fungos dimórficos (BORGES-WALMSLEY e WALMSLEY, 2000). Chen e colaboradores (2007) mostraram que a adição de 10 mM de dibutilil-AMPC retardou a transição M-Y em *P. brasiliensis*, confirmando que esta via de sinalização é importante na mudança morfológica.

A mudança morfológica no *P. brasiliensis* é acompanhada de extensas mudanças na composição da parede celular, como migração e reorganização dos lipídeos de membrana, especialmente glicosfingolipídeos. Outras mudanças importantes são a diminuição na quantidade de proteínas, o aumento no conteúdo de quitina (de 7 a 18 % na forma M para 37 a

48 % na forma Y) e uma mudança na ligação de glucana de  $\beta$ -1,3-glucana, único polímero presente na parede celular da forma M, para  $\alpha$ -1,3-glucana quando o fungo adota a fase Y (KANETSUNA *et. al.*, 1969; SAN-BLAS e SAN-BLAS, 1984). Experimentos de hibridação em microarranjos de DNA realizados por Nunes e colaboradores (2005), mostraram o aumento na expressão de genes responsáveis por enzimas quitino-sintases e diminuição na expressão das quitinases (enzimas degradadoras de quitina) durante a transição M-Y, resultado condizente com a composição da parede fúngica nestes dois estados. A perda de virulência em cepas com mutação induzida, ou submetidas a várias passagens *in vitro*, geralmente coincide com a diminuição da espessura da parede celular e do seu conteúdo de  $\alpha$ -1,3-glucana, características estas reversíveis após passagem em animal ou cultivo na presença de soro fetal bovino (SAN-BLAS e SAN-BLAS, 1984). O aumento na concentração de quitina na parede celular já foi citado por alguns autores como um potencial fator de virulência e mutantes com menor teor de  $\alpha$ -1,3-glucana tendem a ser mais bem digeridos por fagócitos, mostrando-se avirulentos em camundongos (COX e BEST, 1972; HOGAN, KLEIN e LEVITZ, 1996). Dentre os genes que influenciam na virulência, destacam-se genes relacionados ao metabolismo, biossíntese de parede celular (principalmente quitino-sintases e  $\alpha$ -1,3-glucana) e detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) (KANETSUNA *et. al.*, 1969; SAN-BLAS e SAN-BLAS, 1984; HECTOR, 1993; SILVA, ALVES e FIGUEIREDO, 1994; SELITRENNIKOFF e NAKATA, 2003; FELIPE *et. al.*, 2005; TAVARES *et. al.*, 2005).

O principal componente antigênico descrito em *P. brasiliensis* é a gp-43 (PUCCIA *et al.*, 1986), uma glicoproteína exocelular secretada pelo fungo durante a fase patogênica, que contém uma única cadeia de oligossacarídeos (ALMEIDA *et al.*, 1996) e é detectada no soro de pacientes com PCM aguda e crônica (MENDES-GIANNINI *et al.*, 1989). O gene que codifica para esta proteína é um dos genes mais intensamente expressos durante a transição M-Y (NUNES *et al.*, 2005). Anticorpos contra a gp-43 são dirigidos contra epítomos peptídicos conformacionais (PUCCIA e TRAVASSOS, 1991) e são reconhecidos no soro da maioria dos pacientes com PCM (CAMARGO *et al.*, 1994). Pacientes com PCM severa apresentam altos títulos de anticorpos contra gp-43, os quais tendem a decrescer com o tratamento bem sucedido (MENDES-GIANNINI *et al.*, 1990; BLOTTA e CAMARGO, 1993). Respostas negativas e reduzidas ao anticorpo geralmente apontam para um bom prognóstico e a cura clínica (RESTREPO *et al.*, 1978; FRANCO, 1987; MENDES-GIANNINI *et al.*, 1990).



Estudos recentes indicam a presença de vários genes que estão expressos de maneira distinta na fase micelial e leveduriforme de fungos dimórficos patogênicos (NEMECEK, WUTHRICH e KLEIN, 2006) como *P. brasiliensis* (da SILVA *et al.*, 1999; VENANCIO *et al.*, 2002; NUNES *et al.*, 2005). Um membro da família de proteínas de estresse e choque térmico (“heat shock protein” ou HSP), a Hsp70 foi caracterizada e sua expressão diferencial foi demonstrada na fase de levedura, podendo estar relacionada à interação parasita-hospedeiro durante o processo infeccioso (da SILVA *et al.*, 1999). Quando exposto a estresse ambiental, tal como o aumento da temperatura, os organismos respondem com um rápido aumento da produção de HSP que presumivelmente protegem as células contra efeitos deletérios deste tipo de estresse. Apesar do estudo de HSP ainda ser restrito em *P. brasiliensis*, outro trabalho mostrou variações nas respostas dos genes de membros da família das HSP, alguns aumentando e outros diminuindo sua expressão, durante a transição M-Y (NUNES *et al.*, 2005).

Outro destes genes observados foi o da histidina quinase, que pertence a um grupo de proteínas de transdução de sinal utilizadas para responder a sinais ambientais e controlar o processo de desenvolvimento. Homólogos deste gene foram encontrados em *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* e *C. immitis*. As seqüências e os domínios chave desta proteína são altamente conservados em *H. capsulatum* e *C. immitis*. Além da presença em múltiplas espécies, a função desta proteína também está conservada nos fungos *B. dermatitidis* e *H. capsulatum*, organismos em que regula o dimorfismo e a expressão de genes de virulência e patogenicidade, o que sugere que ela possa desempenhar esta função em outros fungos dimórficos (VENANCIO *et al.*, 2002).

Um gene que também merece destaque é o da 4HPPD (4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase), Nunes e colaboradores (2005) demonstraram que este gene teve sua expressão aumentada na fase leveduriforme, e sua inibição bloqueou a diferenciação micélio-levedura em *P. brasiliensis*. Além destes, outros genes que foram apontados nos estudos de expressão diferencial entre micélio e levedura podem estar ligados à resposta e adaptação do fungo ao estresse oxidativo e nitrosoativo, o que possibilita um maior conhecimento da transição dimórfica deste fungo e sua interação e adaptação ao hospedeiro (NUNES *et al.*, 2005).

## 1.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA PCM

Como a porta de entrada do *P. brasiliensis* no organismo humano é a inalação, o primeiro ataque do sistema imunológico é realizado pelos macrófagos alveolares, células derivadas de monócitos do sangue periférico transformadas após sua migração para o pulmão (GONZALEZ *et al.*, 2000; FLAHERTY, MONICK e HINDE, 2006), que promovem a fagocitose dos microrganismos.

Alguns estudos sugerem que os macrófagos desempenham um papel fundamental na resistência ao *P. brasiliensis*, fagocitando o fungo, que pode replicar-se no interior da célula na ausência, mas não na presença de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (BRUMMER *et al.*, 1988; BRUMMER *et al.*, 1989). Dados clínicos e experimentais indicam que a resposta imune celular é o principal mecanismo de defesa contra a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*, mais que a resposta imune humoral, pois anticorpos específicos produzidos em grandes quantidades não conferem proteção a PCM (CAMARGO e FRANCO, 2000; BENARD *et al.*, 2001). Estudos preliminares demonstraram que macrófagos murinos ativados com IFN- $\gamma$  exerceram um papel fungicida tanto em leveduras quanto em conídios de *P. brasiliensis*, o que sugere que as citocinas, especialmente a IFN- $\gamma$ , desempenham um papel importante na proteção contra a PCM (GONZALEZ *et al.*, 2000), como já havia sido demonstrado por Cano e colaboradores (1998a) em que a diminuição de IFN- $\gamma$  piorou o quadro de PCM em camundongos infectados. Este dado também foi demonstrado em outro estudo utilizando modelo murino, uma vez que os animais com a atividade de macrófagos bloqueada foram extremamente suscetíveis à infecção. Na ausência de tais citocinas, como em hospedeiros suscetíveis, os macrófagos servem como um ambiente seguro no qual o fungo pode replicar-se intracelularmente e disseminar-se a partir dos pulmões para outros órgãos (BRUMMER *et al.*, 1989; NASCIMENTO *et al.*, 2002; ANDRADE *et al.*, 2005). A análise do perfil de produção de citocinas por monócitos de indivíduos saudáveis desafiados com isolados de *P. brasiliensis* que são altamente virulentos (Pb18) e também com os que apresentam menor virulência (Pb265), mostrou que o isolado mais virulento induz a produção de citocinas pró e antiinflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10) em menos tempo, além de produzi-las de forma contínua e em níveis mais elevados. Os altos níveis de produção de IFN- $\gamma$  e fator alfa de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) também foram detectados em cultura de células, de paciente curados de PCM, após estímulo com a glicoproteína gp-43 (KUROKAWA, *et al.*, 2007; SADAHIRO, 2007).

Os macrófagos e monócitos ativados por IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ou lipopolissacarídeos (LPS) aumentam seu consumo de O<sub>2</sub> 15 a 20 vezes em um processo chamado “burst” respiratório. Isto é realizado para a ativação da NADPH oxidase ligada à membrana, que reduz oxigênio (O<sub>2</sub>) à superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), produzindo uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) (CURNUTTE, WHITTEN e BABIOR, 1974). O “burst” respiratório é um importante componente dos armamentos utilizados por estes leucócitos para matar microrganismos invasores, como o *P. brasiliensis*, e sua ausência genética resulta em uma hipersensibilidade para infecções granulomatosas crônicas (JENDROSSEK *et al.*, 1997). Outras espécies reativas produzida pelos macrófagos, também com atividade citotóxica, são as de nitrogênio (ERNs) como o óxido nítrico (NO) (NATHAN, 1987; DRAPIER, WIETZERBIN e HIBBS, 1988; BOCCA *et al.*, 1998; GONZALEZ *et al.*, 2000). Foi demonstrado que existe uma associação entre altos níveis de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o efeito fungicida em pacientes com PCM, o que sugere que os metabólitos de O<sub>2</sub> estão envolvidos na morte dos fungos por estas células (CANO *et al.*, 1995; CALVI *et al.*, 2003). Vários macrófagos normalmente se unem para facilitar a fagocitose e a digestão do microrganismo, formando as chamadas células gigantes multinucleadas e células epitelióides que contêm em seu interior os granulomas imunológicos (moléculas imunogênicas normalmente liberadas por patógenos), provendo a característica de doença granulomatosa para a PCM. Acredita-se que a formação de granulomas tenha com objetivo circunscrever e eliminar o agente estranho (BRITO e FRANCO, 1994).

Alguns estudos demonstraram que a morte deste fungo por macrófagos murinos ativados parece ser independente de ERO, uma vez que não foi contida pelas enzimas superóxido dismutase e catalase. (BRUMMER, HANSON e STEVENS, 1988). Além de ter sido verificada a inibição do crescimento de *P. brasiliensis*, por NO e ERN, o tratamento com diferentes inibidores de NO (arginase, N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina e aminoguanidina) reverteu a inibição do processo de transição dimórfica, o que sugere que este fenômeno é mediado pela produção de NO (NASCIMENTO *et al.*, 2002; GONZALEZ *et al.*, 2000). No entanto, em um estudo mais recente Moreira e colaboradores (2008) mostraram que a ativação de macrófagos murinos por IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  matou leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18) por mecanismos de liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO. Neste trabalho a adição de catalase e/ou N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina reduziu consideravelmente a morte do fungo por macrófagos ativados.

Hoje é bem estabelecido que uma grande quantidade de NO é produzida durante infecção microbiana causada por quase todos os patógenos, incluindo bactérias, vírus, parasitas e fungos (ZAKI, AKUTA e AKAIKE, 2005). Em *P. brasiliensis*, estudos recentes

indicaram que IFN- $\gamma$  ativa a produção de NO pelos macrófagos, e esta espécie reativa de nitrogênio inibe a transformação de conídios para levedura e apresenta atividade microbicida (BOCCA *et al.*, 1998; GONZALES *et al.*, 2000), semelhante ao que já foi verificado em outros microrganismos patogênicos, como *Leishmania major* (MATTNER *et al.*, 2004), *Trypanosoma cruzi* (SILVA, MACHADO e MARTINS, 2003), *Plasmodium falciparum* (CLARK *et al.*, 1992), *Schistosoma mansoni* (JAMES e GLAVEN, 1989), *Candida albicans* (BLASI *et al.*, 1995) entre outros. Embora o mecanismo envolvido na resistência da PCM não seja bem compreendido, o TNF- $\alpha$  parece participar da formação de granulomas que restringem a disseminação do fungo, enquanto o NO deve participar do processo de morte deste patógeno (NASCIMENTO *et al.*, 2002). Os dados apresentados por Nascimento e colaboradores (2002), em estudo realizado com camundongos resistentes e suscetíveis, indicam que a produção de NO é essencial para o controle da PCM, uma vez que independentemente da cepa utilizada (resistente ou suscetível), a deficiência na produção de NO causou infecção disseminada. Porém, este estudo também mostrou que a maior diferença na resposta de macrófagos está relacionada à produção de NO e TNF- $\alpha$ . Macrófagos de camundongos suscetíveis liberam uma quantidade grande e persistente de NO durante a infecção, enquanto os de camundongos resistentes produziram predominantemente TNF- $\alpha$ , o que sugere que a produção exacerbada de NO provavelmente iniba a produção de TNF- $\alpha$ .

Gonzalez, Restrepo e Cano (2007) demonstraram que o mecanismo fungicida mediado pelo NO por macrófagos ativados com IFN- $\gamma$  contra conídios de *P. brasiliensis* é dependente de interação com ferro, provavelmente por inibição de enzimas que contém este metal. Neste estudo foi observado que em macrófagos ativados, a ação inibitória do NO foi revertida com a adição de doadores de ferro, sem que houvesse alteração na produção de NO.

As ERO e ERN são críticas na defesa do hospedeiro não apenas por causarem danos aos patógenos, mas também por serem moléculas imunorreguladoras, que podem exercer papéis de sinalização intracelular. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por exemplo, além de afetar a proliferação de células vizinhas, pode facilitar a aderência do fagócito ao endotélio por aumentar a produção de moléculas de adesão. ERO podem promover um aumento da permeabilidade vascular, embora a extensão desta contribuição *in vivo* não esteja bem estabelecida. ERN e ERO podem estimular a produção de citocinas por fibroblastos e células epiteliais, além de alterarem a ativação de fagócitos e agregação plaquetária (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

## 1.5 ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio molecular ( $O_2$ ) é essencial para a sobrevivência de organismos aeróbicos. No entanto, esse mesmo  $O_2$  pode tornar-se tóxico pela geração de agentes oxidantes do tipo radicais livres ou EROs que são gerados como intermediários da cadeia respiratória, tais como o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o  $H_2O_2$  e o radical hidroxil ( $HO^{\cdot}$ ). Essas EROs são extremamente prejudiciais à mitocôndria, onde são geradas em sua maioria, e ao sair desta, aos componentes celulares como o DNA, lipídeos e proteínas (FRIDOVICH, 1998). Sua produção e consumo constantes devem respeitar um equilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes. Quando este equilíbrio é desfeito a favor dos oxidantes, tem-se uma situação comumente chamada de estresse oxidativo (SIES, 1997). Esta é uma situação não incomum em organismos multicelulares, incluindo o homem, fazendo parte da sua fisiologia e patologia. Para proteger as células dos danos causados pelo estresse oxidativo, os organismos aeróbicos possuem sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (FRIDOVICH, 1998).

No sistema enzimático de detoxificação contra EROs, pode-se verificar a existência de três principais grupos de enzimas, a saber: as superóxido dismutases (SODs), as catalases (FRIDOVICH, 1998) e as peroxidases (BAI, HARVEY e McNEIL, 2001)

As superóxido dismutases catalisam a transformação de  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$  e são componentes fundamentais na defesa celular contra o estresse causado por superóxidos (FRIDOVICH, 1995). Existem quatro tipos de SODs relatados, baseados nos metais presentes no seu sítio ativo: superóxido dismutase de cobre-zinco (Cu/Zn-SOD), superóxido dismutase de manganês (Mn-SOD), superóxido dismutase de ferro (Fe-SOD) e superóxido dismutase de níquel (Ni-SOD), sendo esta última recentemente descrita em *Streptomyces griseus* (FRIDOVICH 1998; MATES e SANCHEZ-JIMENEZ, 1999). Organismos procarióticos, tipicamente, possuem Fe-SOD e Mn-SOD, enquanto células eucarióticas possuem a enzima Mn-SOD localizada na mitocôndria e Cu/Zn-SOD no citosol (FRIDOVICH, 1998).

As catalases têm um papel fundamental na detoxificação da  $H_2O_2$ , produzindo  $H_2O$  e  $O_2$ . As catalases ou hidroperoxidases são constituintes típicos de peroxissomos, onde  $H_2O_2$  leva a processos como a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (FRIDOVICH, 1998). Existem três famílias distintas de catalases: Mn-catalases, catalase-peroxidase bifuncional e a monofuncional ou catalase verdadeira. A primeira família tem sido relatada apenas em procariotos, enquanto a segunda é encontrada em procariotos e em eucariotos simples. A terceira família pode ser dividida em duas classes: as pequenas subunidades (50-65 kDa) e as grandes subunidades (aproximadamente 80 kDa). A primeira classe inclui um grande número

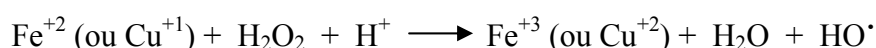
de catalases de bactérias, plantas, fungos e animais. Várias catalases da segunda classe têm sido identificadas em bactérias e fungos filamentosos (KLOTZ, KLASSEN e LOEWEN, 1997; KAWASAKI e AGUIRRE, 2001; ANGELOVA *et al.*, 2005).

As peroxidases, como a glutaciona peroxidase, peroxirredoxina (ou tiorredoxina) e a citocromo C peroxidase (presente em leveduras), também desempenham papel de alta importância na transformação de  $H_2O_2$  produzindo  $H_2O$  e  $O_2$  (FRIDOVICH, 1998). A combinação de glutaciona peroxidase e glutaciona redutase é bastante efetiva na proteção contra a oxidação por compostos à base de nitrogênio, como o peroxinitrato (SIES *et al.*, 1997). A glutaciona peroxidase é formada por quatro subunidades protéicas, cada uma contendo um átomo de selênio no seu sítio ativo. Esta enzima catalisa a ligação de duas moléculas de glutaciona com selenoproteínas que foram oxidadas por peróxidos, recuperando a selenoproteína e formando a glutaciona oxidada. Esta última será reduzida pela enzima glutaciona redutase às custas de um NADPH. A reposição de NADPH é extremamente importante para manutenção deste ciclo antioxidante e normalmente se dá por meio da via pentose fosfato, pelas enzimas glicose 6-fosfato desidrogenase, que converte glicose 6-fosfato em 6-fosfogluconato e ao mesmo tempo  $NADP^+$  à NADPH e 6-fosfogluconato desidrogenase, que converte 6-fosfogluconato em D-ribulose 5-fosfato e  $NADP^+$  à NADPH, liberando  $CO_2$ . Assim, a detoxificação promovida pelas peroxidases é dependente da via pentose fosfato, que recicla coenzimas utilizadas no processo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

Como exemplo de sistema de defesa não-enzimático, é possível citar agentes antioxidantes como o ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), carotenóides (vitamina A) e glutaciona (KANTER *et al.*, 2005). O ácido ascórbico é facilmente oxidado, gerando o ácido dihidroascórbico, neutralizando o agente oxidante. O ácido dihidroascórbico é então reduzido pela enzima glutaredoxina glutaciona-dependente, voltando à forma de ácido ascórbico (PARK e LEVINE, 1996; WANG *et al.*, 1997). O tocoferol também age com antioxidante, neutralizando principalmente agentes oxidantes nitrosos (CHRISTEN *et al.*, 1997; HALLIWELL, RAFTER e JENNER, 2005). A glutaciona reduzida (GSH) é um tripeptídeo ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinilglicina) que funciona como substrato para as enzimas da família das glutaciona peroxidases, uma importante via de detoxificação de  $H_2O_2$  (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Além disso, a GSH está envolvida em uma série de outros processos metabólicos, como o metabolismo do ácido ascórbico (como visto acima), manutenção da comunicação entre células (BARHOUMI *et al.*, 1993), transporte intracelular de cobre (PEDERSEN *et al.*, 1996), quelando ions cobre e diminuindo a possibilidade de formação de radicais livres (Reação de Fenton) (HANNA e MASON, 1992), protegendo

grupos –SH de proteínas contra oxidação e reações cruzadas entre outros (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

Os metais como  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Cu}^{+2}$  são importantes co-fatores em várias funções protéicas como transporte, desenvolvimento, crescimento e transporte de elétrons. No entanto, suas concentrações intracelulares devem ser extremamente bem controladas, pois podem catalisar a formação de radicais hidroxil em uma reação conhecida como Reação de Fenton (CROSS *et al.*, 2003; VALAVANIDIS, VLAHOYIANNI e FIOTAKIS, 2005):



A produção intracelular de enzimas do sistema antioxidante e outras substâncias que podem estar ligadas a processos de oxido-redução, como transportadores de metais (ferro e cobre), pode ser regulada por estímulos externos, como o estresse oxidativo artificialmente induzido no meio, permitindo analisar o perfil transcricional dos genes envolvidos neste processo (RICCI, JANULCZYC e BJÖRCK, 2002; BOOJAR e GOODARZI, 2006). Substâncias como Paraquat<sup>®</sup> (metil-viologen) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  são comumente usadas para criar ambientes artificiais de estresse oxidativo (BAI, HARVEY e McNEIL, 2001; MULLER, GAULEY e HEIKKILA, 2004; BAILIAK *et al.*, 2005; SAH *et al.*, 2005; TU *et al.*, 2005; BRANCO *et al.*, 2008) por este motivo foram selecionadas para execução deste trabalho. Angelova e colaboradores (2005) verificaram a resposta de 12 espécies de fungos filamentosos (*Mucor racemosus*, *Humicola lutea*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Aspergillus niger* entre outros) ao estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio e Paraquat<sup>®</sup>, utilizando concentrações de 30 mM de peróxido de hidrogênio e 5 mM de Paraquat<sup>®</sup> por 5 horas. Os resultados deste trabalho mostram aumentos significativos da atividade de catalase (em resposta a peróxido de hidrogênio) e superóxido dismutase (em resposta ao Paraquat<sup>®</sup>) indicando que estas concentrações dos agentes oxidantes e o tempo de tratamento foram suficientes para ativar as defesas destes fungos. Em 2006, Kwon, Jeong e Roe mostraram que a partir de 4 horas de tratamento com 2 mM de Paraquat<sup>®</sup> houve inibição da produção de homocitrato sintase em cepas mutantes de *Schizosaccharomyces pombe* com o gene de superóxido dismutase de cobre e zinco inativado.

### 1.5.1 PARAQUAT®

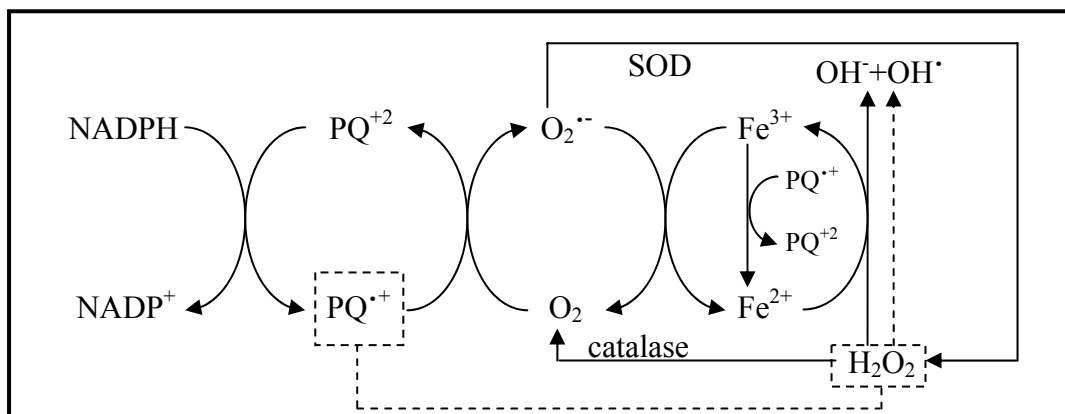
Paraquat® ou metil-viologen (1,1-dimetil-4,4 bipiridilium dicloreto) tem sido utilizado como indicador de oxido-redução desde 1932 e em 1955 foi descoberta sua atividade herbicida. Desde então, tem sido muito utilizado na agricultura para exterminar uma ampla variedade de ervas daninhas (BROMILOW, 2003). A exposição profissional ao Paraquat® não acarreta em perigo à saúde se o modo de utilização e as regras de segurança forem seguidos corretamente. No entanto, é grande o número de casos de intoxicação acidental ou voluntária. A via de intoxicação mais freqüente e estudada é a oral, mas pode também ocorrer por inalação ou contato dérmico com possibilidade de afetar todos os órgãos, mas atacando preferencialmente os pulmões, fígado e rim (SERRA, DOMINGOS e PRATA, 2003). Em plantas, o íon Paraquat® atua no cloroplasto, sendo convertido à sua forma radicalar pelos elétrons livres da fotossíntese na presença de luz. Rapidamente o oxigênio presente no cloroplasto recebe este elétron do Paraquat® ( $K_2 = 7,7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) sendo convertido então à superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000; BROMILOW, 2003). Em relação ao meio-ambiente tem baixa toxicidade, pois em contato com a terra a molécula torna-se biologicamente inativa (BROMILOW, 2003).

Estudos realizados em *E. coli* mostram que o NADH doa elétrons para o  $\text{O}_2$  através da cadeia transportadora de elétrons para formação de  $\text{H}_2\text{O}$ ; no entanto, o NADPH doa elétrons diretamente ao Paraquat® quando este está presente, gerando sua forma radicalar que na presença de  $\text{O}_2$  leva a formação de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (HASSAN e FRIDOVICH, 1979).

Na presença de enzimas como superóxido dismutases o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  é convertido a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Além de poder levar a formação espontânea de radicais hidroxil, foi demonstrado por Winterbourn (1981) que  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode também reagir com íons Paraquat® produzindo radicais hidroxil, sendo esta uma das prováveis causas da toxicidade deste último. No mesmo trabalho, foi descrita que esta reação é rápida o suficiente para competir com a reação entre o íon Paraquat® e o  $\text{O}_2$ , além disso, não é necessária a presença de metais para catalizar esta reação. Por outro lado, estudos posteriores mostraram que metais de transição como ferro e cobre, potencializam o efeito tóxico do Paraquat® em *E. coli* e camundongos (KOHEN e CHEVION 1985a; KOHEN e CHEVION 1985b; KORBASHI *et al.*, 1986).

De acordo com os resultados descritos nos trabalhos citados vê-se que o efeito tóxico do Paraquat® pode ocorrer na presença ou ausência de íons metálicos, mas deve estar associado à geração de radicais hidroxil. O mecanismo de ação é mostrado na figura 05.





**Figura 05:** Esquema de reações demonstrando o mecanismo de ação do Paraquat<sup>®</sup>. PQ<sup>+2</sup> = íon Paraquat<sup>®</sup>, PQ<sup>+•</sup> = radical Paraquat<sup>®</sup>. As mesmas reações podem ocorrer na presença de Cu<sup>2+</sup>/Cu<sup>3+</sup> no lugar de Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>. (Fonte: adaptado de KORBASHI *et al.*, 1986.)

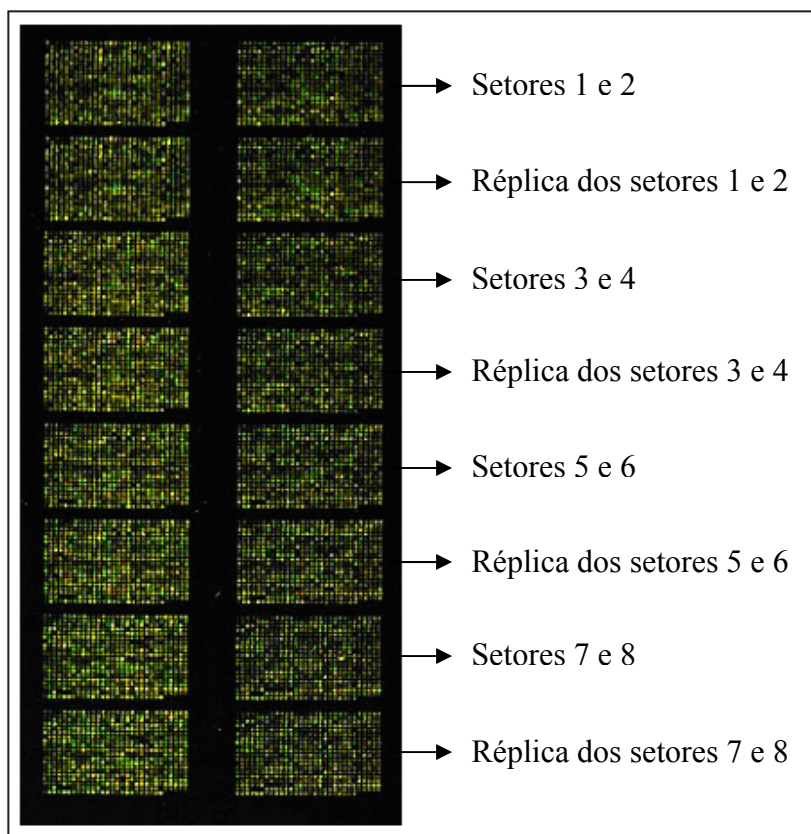
Neste trabalho utilizamos o Paraquat<sup>®</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para mimetizar um ambiente de estresse oxidativo ao qual o *P. brasiliensis* é submetido quando fagocitado por macrófagos alveolares, com a intenção de verificar mecanismos de defesa deste microrganismo contra o ataque fagocitário, através do aumento ou diminuição da expressão de genes ligados direta ou indiretamente a sistemas antioxidantes. Como um microrganismo aeróbico patogênico, o *Paracoccidioides brasiliensis* possui sistemas de defesa enzimáticos e não enzimáticos contra estresse oxidativo, com dupla função, sendo a primeira a defesa contra o estresse oxidativo gerado internamente e a segunda, defender-se do ataque oxidativo gerado pelos macrófagos no processo de fagocitose. Análises *in silico* de seqüências expressas (“expressed sequence tag” – EST) deste fungo mostram a presença de uma grande quantidade de genes envolvidos em defesa antioxidante, tais como superóxido dismutases, catalases, peroxirredoxina, citocromo C peroxidase, tioredoxina, síntese de glutathione, entre outros (CAMPOS *et al.*, 2005). Muitos destes genes têm sido estudados individualmente em diferentes organismos (BAILIAK *et al.*, 2005; TIMOFEYEV *et al.*, 2006; YANG, PANEK e O’BRIAN, 2006), no entanto para entender como o *Paracoccidioides brasiliensis* utiliza-se destas defesas, se faz necessária uma metodologia que analise uma grande quantidade de genes em um mesmo experimento, como a hibridação em microarranjos de DNA. Utilizando esta metodologia, Pimentel (2007) avaliou as respostas deste fungo a um agente gerador de espécies reativas de nitrogênio (S-nitroso glutathione - GSNO), demonstrando a ativação de mecanismos de defesa baseados principalmente em seqüestradores de NO e ERN. A análise conjunta da resposta ao agente nitrosoativo obtida por Pimentel e aos agentes oxidativos deste trabalho pode mostrar caminhos utilizados pelo fungo para sobreviver dentro de macrófagos.

## 1.6 HIBRIDAÇÃO EM MICROARRANJOS DE DNA

Conhecer um organismo do ponto de vista genômico, é saber que genes estão presentes no seu genoma. Além disso, é preciso saber em que situações e em quais circunstâncias, estes genes são expressos ou não, ou até mesmo quando comparando diferentes situações, saber quais genes passam a serem mais ou menos expressos na nova condição. Estas análises são chamadas de estudos de expressão gênica diferencial. Esses conhecimentos foram inicialmente adquiridos por meio de técnicas que analisavam as diferenças de expressão dos genes individualmente. A técnica de arranjos de DNA surgiu então como uma ferramenta para monitorar a expressão gênica em larga escala (HOFMAN, 2005).

Um arranjo de DNA é preparado sobre uma matriz (suporte sólido), como uma lâmina de vidro ou uma membrana, na qual grandes quantidades de amostras de DNA estão distribuídas e aderidas de maneira ordenada. Existem basicamente dois tipos de arranjos: os macroarranjos ou “macroarrays” e os microarranjos ou “microarrays”. Nos macroarranjos, as amostras de DNA são distribuídas em membranas de nylon ou nitrocelulose, em pequenos pontos que medem 300  $\mu\text{m}$  ou mais. Uma típica membrana para macroarranjo mede 22 X 22 cm e pode carregar amostras referentes a até 2000 genes (SASAKI *et al.*, 2001). Já os microarranjos são usualmente, feitos em uma lâmina de vidro especial, semelhante àquelas utilizadas em microscopia óptica. Os pontos de um microarranjo possuem um diâmetro de até 200 $\mu\text{m}$ , e são distribuídos por robôs (“arrayers”) de alta precisão, em um grau de compactação muito maior que os macroarranjos. Normalmente, um típico microarranjo é capaz de carregar até 10.000 pontos distribuídos em uma área de 2 X 7 cm (CHEUNG *et al.*, 1999). O DNA pode ser depositado ou sintetizado diretamente no suporte e as amostras podem ser de DNA, DNA complementar (cDNA) ou oligonucleotídeos (SOUTHERN, MIR e SHCHEPINOV, 1999). Esta estrutura pode também ser chamada de chip de DNA ou microchip. Quando um chip carregar informações de todos os genes de um genoma, ele pode ser chamado de “biochip”.

A produção de um chip de DNA começa pela seleção das amostras de DNA que irão formá-lo. Normalmente, microarranjos de eucariotos são construídos utilizando fragmentos de EST do genoma, amplificados por PCR a partir de clones oriundos de uma ou mais bibliotecas de cDNA. Estes produtos de PCR são então purificados e fixados à matriz escolhida (Figura 06) (DUGGAN *et al.*, 1999).



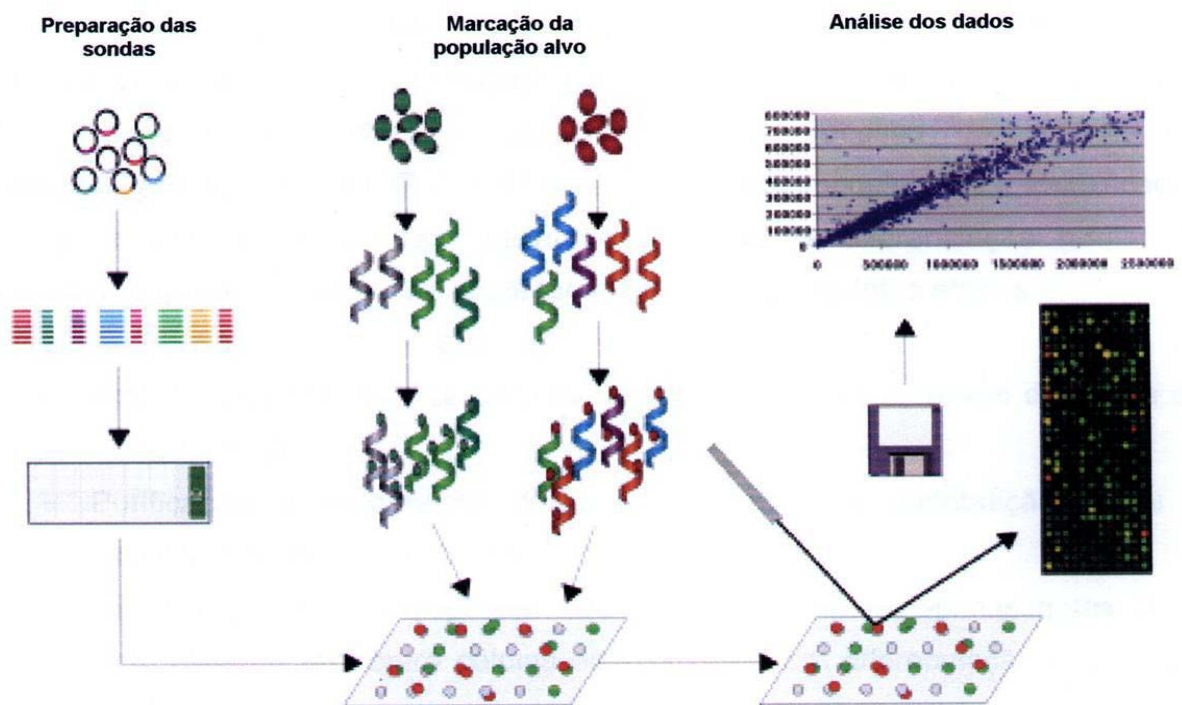
**Figura 06:** Arquitetura do “chip” de *Paracoccidioides brasiliensis* utilizado na hibridação competitiva por microarranjos de DNA. Estão assinalados os setores aplicados em duplicata, onde a réplica foi depositada imediatamente abaixo do setor correspondente. (Fonte: LEITE, 2005.)

A técnica de hibridação em microarranjos é baseada no princípio da complementaridade de bases do DNA e sua capacidade de ligar-se especificamente, ou hibridar, ao DNA molde do qual foi gerado, ou em outro com a mesma seqüência de nucleotídeos (SOUTHERN, MIR e SHCHEPINOV, 1999; TZOUVELEKIS, PATLAKAS e BOUROS, 2004).

Em um estudo de expressão gênica diferencial, diferentes cDNAs, gerados a partir de “pools” de RNAs extraídos de diferentes populações, marcados com diferentes fluoróforos (moléculas fluorescentes acopladas a uma base nitrogenada) podem competir durante a hibridação com o DNA do chip. Após a lavagem, para retirar o excedente de material, os híbridos podem ser detectados com uma varredura por “scanner”, usando comprimentos de onda capazes de detectar os sinais de excitação referentes aos dois fluoróforos separadamente. Utilizando um microchip contendo milhares de amostras de DNA, pode-se determinar, em um único experimento, o nível de expressão de milhares de genes de uma célula pela mensuração da quantidade de RNA mensageiro (mRNA) hibridado, sob a forma de cDNA, a cada posição ou “spot” do chip. Quanto maior a expressão de um gene, em uma determinada condição, maior será a intensidade do sinal captada pelo “scanner” para um “spot” do microarranjo que

contém a seqüência deste gene, possibilitando a inferência de funções gênicas a partir da análise das variações globais observadas no transcriptoma da célula, revelando também interações entre diferentes vias de sinalização (TZOUVELEKIS, PATLAKAS e BOUROS, 2004; HOFMANN, 2005).

Os dados são então transferidos para programas de computador que analisam e quantificam a intensidade de cada um dos “spots”, resultando em um gráfico de dispersão onde podem ser observados e destacados para uma análise mais aprofundada, os genes constitutivamente expressos, e os super e sub-regulados (Figura 07) (SASAKI *et al.*, 2001; DUGGAN *et al.*, 1999).



**Figura 07:** Metodologia de hibridação em microarranjos de DNA. O esquema mostra, à esquerda, o processo de preparação das sondas, que são amplificadas por PCR, a partir de bibliotecas gênicas, purificadas e distribuídas na superfície de lâminas de vidro para a fabricação dos “biochips”. Na parte central da figura, é possível ver a marcação das populações alvo de RNA (teste e referência) com dois fluoróforos diferentes, para a hibridação sobre o “biochip”; à direita, é mostrado o processo de obtenção das imagens, com um “scanner” capaz de ler os comprimentos de onda referentes a cada fluoróforo e, por fim, a análise dos dados realizada por programas de computador. (Fonte: modificado de SOUTHERN CALIFORNIA COASTAL WATER RESEARCH PROJECT, 2009.)

Apesar da utilização de controles internos para montagem do “chip” e da repetição dos experimentos em replicatas como forma de aumentar a confiança estatística do método de microarranjos, validações dos resultados por outros métodos de quantificação de mRNA são imprescindíveis para uma correta análise dos resultados. As técnicas mais comumente usadas nestes casos são northern blot, hibridação *in situ*, imunoblot e RT-PCR quantitativo em tempo

real, sendo este último o mais utilizado por ser relativamente barato e rápido (CHUAQUI *et al.*, 2002).

### 1.7 RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL(qPCR)

A amplificação de amostras de DNA é um marco importante na genômica. A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é comumente utilizada viabilizando vários estudos. A partir da utilização de uma enzima encontrada em vírus, denominada transcriptase reversa, foi possível converter amostras de RNA em DNA, chamado de DNA cópia (cDNA), a partir do qual foi possível realizar uma amplificação por PCR. Esta técnica recebeu o nome de RT-PCR (PCR com transcriptase reversa). Como as amplificações nestas técnicas são, teoricamente, exponenciais, é possível presumir a quantidade inicial de material genético baseando-se no número de ciclos e quantidade final de material. No entanto não possuem grande precisão (BUSTIN *et al.*, 2005).

Conceitualmente simples e prático, o método de detecção de fluorescência em tempo real é o mais amplamente utilizado para quantificação de RNA mensageiro (mRNA) em pesquisas de transcrição *in vitro* (LIU, FELDMAN e CHUNG, 2002; GINZINGER, 2002). Este método mede o acúmulo, a cada ciclo, dos produtos de amplificação por PCR, por meio da emissão de fluorescência das sondas adicionadas a reação. Esta técnica permite uma quantificação bastante precisa e reprodutível do número de cópias do gene, ou RNA estudado (HEID *et al.*, 1996; LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Ela tem sido amplamente usada para análise de expressão de genes isolados e para confirmar dados obtidos em experimentos de hibridação em microarranjo de DNA (RAJEEVAN *et al.*, 2001; BONAVENTURE *et al.*, 2002; DONNINGER *et al.*, 2004; NUNES *et al.*, 2005).

As suas principais vantagens em relação ao PCR ou RT-PCR comuns são: a técnica não exige um processamento das amostras após o PCR e ela analisa esta amplificação na fase de crescimento exponencial do número de cópias e não na fase de platô como um PCR normal. Nas técnicas comuns de PCR e RT-PCR, após o término dos ciclos, a visualização do resultado somente poderá ser feita após uma eletroforese. Se a intenção é quantificar a amostra inicial, vai ser preciso comparar visualmente as intensidades das bandas geradas no gel, entre si e frente a um padrão. Dessa forma não se consegue muita precisão na mensuração. Além disso, essa manipulação dos produtos pode elevar o risco de contaminação da amostra. No qPCR, a mensuração do número de cópias é feita por meio da fluorescência emitida por sondas que vão sendo incorporadas ou retiradas da dupla fita de DNA formada. A

visualização desta fluorescência é feita por um leitor ótico computadorizado ao término de cada ciclo de duplicação, ou seja, com uma precisão maior e sem pós-processamento (BUSTIN, 2002).

Outro fator interessante é medir estas ampliações no momento em que vão ocorrendo (por isso chamada de tempo real), e na fase exponencial do aumento do número de cópias onde a precisão é maior. De qualquer forma, o número de cópias geradas deve ser proporcional ao número de cópias iniciais, no entanto a eficiência da amplificação vai diminuindo com o passar dos ciclos, por motivos diversos como número de reagentes e eficiência da enzima, até chegar a um platô, onde o número de cópias passa a não aumentar. Por este motivo, a mensuração é mais precisa durante a fase de crescimento exponencial, onde a influencia de fatores limitantes da amplificação é nula ou quase nula, do que na fase de platô, como no PCR e RT-PCR comuns (BUSTIN, 2002).

Vários trabalhos têm sido publicados utilizando esta técnica para confirmar dados e validar experimentos de microarranjos. A comparação dos resultados mostra valores de correlação de Pearson em torno de 70 %, variando entre 13 a 89 %, sendo que 70 a 80 % dos dados avaliados apresentam correlação maior que 60 % (RAJEEVAN *et al.*, 2001; DALLAS *et al.*, 2005; SU *et al.*, 2007; FINDEISEN *et al.*, 2008; DU *et al.*, 2008; BRACKEN *et al.*, 2008). Isto mostra a grande semelhança entre os resultados obtidos pelas duas técnicas, no entanto análises *in silico* são muito importantes para a correta interpretação dos dados (CHUAQUI *et al.*, 2002).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar o perfil transcricional do fungo patogênico humano, *Paracoccidioides brasiliensis*, durante sua exposição a agentes oxidantes, utilizando o método de hibridação em microarranjos de DNA.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os genes modulados pelo *P. brasiliensis* durante exposição ao agente oxidante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;

- Identificar os genes modulados pelo *P. brasiliensis* durante exposição ao agente oxidante Paraquat<sup>®</sup>;

- Confirmar os dados obtidos pelo método de hibridação em microarranjos de DNA utilizando a técnica de qPCR;

- Comparar os genes modulados pelo *P. brasiliensis* em resposta aos dois agentes oxidantes.

- Comparar estes dados com o perfil transcricional obtidos por Pimentel (2007) durante a exposição deste fungo a um agente nitrosoativo (GSNO).

### 3. MÉTODO

#### 3.1 CULTIVO DE *Paracoccidioides brasiliensis*

Em nossos estudos foram utilizadas amostras de *P. brasiliensis* cedidas pela Dra. Rosana Puccia, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e pelo Dr. Francisco Nóbrega, do Instituto de Pesquisa e desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). Este isolado foi identificado como Pb 18 (pode ser descrito em alguns trabalhos como Pb07 – MORAIS *et al.*, 2000) e inicialmente obtido de pacientes que manifestavam a forma crônica da PCM no estado de São Paulo – Brasil.

As amostras foram mantidas em meio sólido YPD modificado (1 % de extrato de levedura, 2 % de peptona, 2 % de dextrose, 2 % de ágar, pH 6,3) a 37° C. Para as exposições das culturas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Paraquat<sup>®</sup> inóculos de 10 % do volume final foram adicionados a meios líquidos YPD a partir de culturas com densidade óptica a 600 nm (D.O.<sub>600</sub>) de aproximadamente 2,0, inoculadas inicialmente a partir do meio de manutenção (YPD sólido).

#### 3.2 CURVA DE CRESCIMENTO NA PRESENÇA DOS AGENTES OXIDANTES

Foi verificado o crescimento do *Paracoccidioides brasiliensis* na presença dos agentes oxidantes, a fim de determinar as concentrações ideais para exposição aos mesmos. Desta forma, acompanhou-se o crescimento de culturas em meio YPD líquido, avaliando sua D.O.<sub>600</sub>, durante 7 dias. Os testes foram realizados em culturas preparadas com um inóculo de 10 % do volume final, a partir de uma cultura em meio líquido com D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 2,0. Na exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizou-se concentrações de 1 mM, 5 mM, 10 mM e 30 mM e a Paraquat<sup>®</sup> concentrações de 0,5 mM, 5 mM, 10 mM e 20 mM. Foram preparadas também culturas nas mesmas condições sem, no entanto, a adição de agentes oxidantes, para servirem como controle. Todos os testes foram feitos em triplicata e as culturas mantidas a 35,5° C com agitação de 125 rpm por 7 dias. O acompanhamento do crescimento fúngico foi realizado por leituras diárias de suas D.O.<sub>600</sub>.



### 3.3 EXPOSIÇÃO AO H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Uma cultura de leveduras de Pb18 em meio YPD líquido (volume final de 300 mL) foi crescida até atingir a D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 2,0, após um inóculo de 10 % do volume final ter sido adicionado, a partir de uma cultura em meio líquido. Esta cultura foi então dividida em três partes iguais. A primeira parte foi exposta à concentração de 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a segunda foi exposta à concentração de 5 mM e a terceira não foi adicionado o agente oxidante, servindo como controle. O tempo total de exposição foi de 5 horas (ANGELOVA *et al.*, 2005; KWON, JEONG e ROE, 2006), com agitação de 125 rpm e temperatura de 35,5° C, quando as células foram então separadas do meio de cultura por filtração a vácuo, com membranas Millipore de 0,22 µm, e submetidas à extração de RNA, de acordo com o protocolo descrito posteriormente (item 3.5 Extração de RNA).

### 3.4 EXPOSIÇÃO AO PARAQUAT<sup>®</sup>

Uma cultura de leveduras de Pb18 em meio YPD líquido (volume final de 300 mL) foi obtida e crescida da mesma forma como descrita anteriormente (item 3.3 Exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Esta cultura foi também dividida em três partes iguais. Às duas primeiras foi adicionado Paraquat<sup>®</sup>, para obter as concentrações de 0,5 mM e 5 mM. A terceira serviu como controle. As culturas foram mantidas sob agitação e temperatura controladas (125 rpm e 35,5° C) durante 5 horas (ANGELOVA *et al.*, 2005, KWON, JEONG e ROE, 2006), quando as células foram separadas do meio de cultura após filtração a vácuo, com membranas Millipore de 0,22 µm, e submetidas à extração de RNA, de acordo com o protocolo descrito a seguir (item 3.5 Extração de RNA).

### 3.5 EXTRAÇÃO DE RNA

Todo o volume das culturas foi filtrado (membranas Millipore 0,22 µm), o “pellet” congelado em nitrogênio líquido e posteriormente macerado em almofariz na presença de nitrogênio líquido. O material triturado foi colocado em 1 mL de Trizol (Invitrogen), contendo o mesmo volume de pérolas de vidro (diâmetro de 2 mm) seguido de agitação intensa em agitador de tubos tipo vórtex por 10 minutos. Após breve repouso e decantação das pérolas, o sobrenadante foi transferido para um tubo plástico de 1,5 mL, onde foram adicionados 200 µL de clorofórmio. O tubo foi agitado no vórtex por 15 segundos e centrifugado a 15300 g por 15 minutos. A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo

tubo onde se adicionou o mesmo volume de isopropanol absoluto gelado (-20° C), este material foi mantido a -20° C por 12 horas para que ocorresse a precipitação. Decorrido este tempo, a amostra foi novamente centrifugada a 15300 g por 30 minutos a 4° C. O pellet foi lavado com etanol 70 %, seco em centrífuga a vácuo (speed vac) por 10 minutos, ressuspensão em 200 µL de água, quantificado por meio da leitura de densidade óptica em um espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 e posteriormente avaliado em gel de agarose desnaturante 1 % (Modificado de MONTE e SOMERVILLE, 2002).

Após estas etapas, o RNA foi então purificado utilizando o sistema RNeasy, segundo especificações do fabricante (Qiagen). Somente foram utilizados os RNAs que não apresentavam degradação visível no gel e cuja densidade óptica mostrasse uma razão D.O.<sub>260</sub>/D.O.<sub>280</sub> entre 1,9 e 2,0. Esta etapa de purificação se faz necessária para a eliminação de pequenas quantidades de materiais como DNA e proteínas que possam ter permanecido na amostra, e conseqüente isolamento do RNA. O princípio da técnica baseia-se na afinidade da coluna, utilizada no kit, ao RNA que se fixa na resina, e os procedimentos de lavagem retiram os demais materiais. Esta purificação permite a obtenção de material com grau de pureza necessária para a reação de transcrição reversa com posterior marcação fluorescente do cDNA obtido.

### **3.6 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA DO RNA E MARCAÇÃO FLUORESCENTE DA SEGUNDA FITA DE cDNA.**

Aproximadamente 30 µg de RNA total, de cada condição de estresse e controle, foram utilizados para síntese de cDNA, selecionando o mRNA pela cauda poli-A, com o iniciador oligo dT. A síntese da 1ª fita de cDNA foi realizada com os seguintes reagentes:

4 µL de oligo dT 100 pmol (5' GCGGCGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTT 3')

1 µL de RNA de λQ 20 ng/µL (controle positivo externo)

0,5 µL de iniciador λQ plus AS 10 µM (5' TTTTTTTTTTTTTTTTGGGTTGG GTAAG 3')

10 µL de RNA alvo (30µg)

4 µL de H<sub>2</sub>O MilliQ autoclavada (RNAse "free")

19,5 µL total

O material foi então submetido ao aquecimento a 70° C por 10 minutos para desnaturação do RNA. Posteriormente, para anelamento dos iniciadores, a reação foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados:

- 6 µL de 5X First Strand Buffer (Invitrogen)
- 3 µL DTT (0,1 M)
- 0,6 µL dNTPs (25 mM de cada dNTP)
- 1 µL de Superscript II RT (200 U/µL – Invitrogen)

As reações foram então incubadas por 2 horas a 42° C, em seguida adicionou-se a cada reação 1 µL de RNase (10 mg/mL) para degradar o RNA molde, deixando-as por 30 minutos a 37° C. A purificação foi realizada em Microcon YM-30 (Millipore) e o volume ajustado para 21 µL.

Para a marcação fluorescente da segunda fita de cDNA, foi utilizada como molde a primeira fita de cDNA obtida na etapa anterior. Assim, os 21 µL obtidos foram aquecidos a 95° C por 5 minutos para a desnaturação do cDNA e então adicionados de:

- 20 µL de 2,5X solução de iniciadores randômicos (BIOPRIME DNA Labelling System<sup>®</sup> – Invitrogen)
- 5 µL de dNTPs mix (24 mM dATP, 24 mM dTTP, 24 mM dGTP e 12 mM dCTP)
- 1 µL Klenow 40 U/µL (BIOPRIME DNA Labelling System<sup>®</sup> – Invitrogen)
- 2 µL de Fluorolink<sup>®</sup> Cy3 dCTP ou Cy5 dCTP 25nmol (Amersham)

A reação foi então incubada a 37° C por 2 horas, a purificação foi realizada em Microcon YM-30 (Millipore) em 3 lavagens consecutivas utilizando 400 µL de H<sub>2</sub>O MilliQ autoclavada e o volume final completamente seco em “speed vac”.

Para cada amostra, foram realizadas duas marcações com inversão de fluoróforos (“Dye Swap”), ou seja, na primeira marcação utilizou-se Cy3 para a amostra controle e Cy5 para a amostra tratada e na segunda marcação usou-se Cy5 na amostra controle e Cy3 em uma das amostras com tratamento.

### **3.7 HIBRIDAÇÃO DOS MICROCHIPS**

A hibridação foi realizada utilizando biochips carregando seqüências representativas de aproximadamente 4692 genes de *P. brasiliensis*, que foi construído pelo Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do NIB (Núcleo Integrado de Biotecnologia) da

Universidade de Mogi das Cruzes (LEITE, 2005). O procedimento foi realizado ressuspendendo cDNA marcado em 100  $\mu$ L de solução de hibridação (6X SSC, 5X Denhardt's, 0,25 mg/mL DNA esperma de salmão, 0,5 % SDS, 50 % formamida e 925 ng/mL poli dT (25 U Amersham)) e aquecida a 95° C por 5 minutos, para a desnaturação do cDNA. A solução foi então hibridada contra o microchip de *P. brasiliensis* por um período de 14 horas a 42° C, em uma estação de hibridação GeneTac (Genomic Solutions).

Foram realizadas em seguida, duas etapas de lavagem em solução 0,5X SSC, 0,01 % SDS, duas etapas em solução 0,06X SSC, 0,01 % SDS e duas lavagens finais em 0,06X SSC. As lavagens também foram realizadas na estação de hibridação GeneTac (Genomic Solutions) e cada lavagem consiste de 1 minuto de fluxo, seguido de 5 minutos de incubação sem agitação, a 25° C. Ao final, a lâmina hibridada foi seca por centrifugação durante 2 minutos a 106 g.

### 3.8 AQUISIÇÃO E ANÁLISE DE IMAGENS

As imagens da hibridação foram obtidas pela leitura das lâminas em um “scanner” óptico Affymetrix 418, nos comprimentos de onda 532 nm (Cy3) e 635 nm (Cy5), gerando imagens independentes para cada um dos fluoróforos. Uma vez que os genes de *P. brasiliensis* estão “spotados” em duplicata no chip, temos duas leituras de razão Cy5/Cy3 para cada gene. Como os experimentos foram duplicados com inversão de fluoróforos (“Dye Swap”), geramos quatro leituras de razão Cy5/Cy3 para cada gene. Em todas as leituras realizadas, a potência do laser e o ganho do fotomultiplicador foram ajustados de forma a minimizar o “background” e evitar a saturação do sinal nos “spots” do “array”.

A análise preliminar dessas imagens foi realizada pelo programa TIGR Spotfinder v.3.1.0 que delimita as áreas dos “spots” a partir da imagem bruta. Utilizando um algoritmo de segmentação de histograma, os “pixels” pertencentes a cada “spot” são identificados e quantificados, gerando um valor integrado de intensidade, já descontado o “background” local. Foram excluídos das análises todos os “spots” que tinham valores inferiores ao “background” local mais duas vezes o desvio-padrão. Os dados referentes às intensidades de fluorescência dos dois canais são salvos em um arquivo de extensão .mev.

Os valores de intensidade contidos nos arquivos .mev foram submetidos a uma série de transformações matemáticas com auxílio do programa TIGR Midas v.2.19. Assim, cada arquivo foi filtrado, de maneira a retirar “spots” cujos valores integrados fossem inferiores a 10.000 unidades análogo-digitais. Depois disso, as intensidades dos dois canais (Cy3 e Cy5)

foram normalizadas pelo algoritmo matemático conhecido como Lowess de regressão não-linear, que utiliza fatores de normalização intensidade-dependentes para diferentes “spots”, de acordo com a intensidade de seus respectivos sinais. As variações nos valores de expressão em cada setor do chip foram então equalizadas, utilizando-se a opção de regularização de desvio-padrão (Block Mode) (YANG *et al.*, 2002).

As planilhas contendo os dados finais das análises foram carregadas em um outro programa do pacote TIGR denominado Multi Experiment Viewer (MEV) v.3.1 onde foi feita a normalização entre os experimentos e a análise de variância (ANOVA) entre os grupos, utilizando-se valor de  $p= 0,01$  como limite de confiabilidade para identificar genes com variação de expressão estatisticamente significativa.

Para permitir uma melhor visualização dos genes superexpressos e subregulados durante a exposição aos agentes oxidantes ( $H_2O_2$  e Paraquat<sup>®</sup>) estes foram agrupados de acordo com seu perfil de expressão. No entanto para definir o número ideal de grupos ou “clusters”, que permitiria a visualização dos diferentes padrões básicos de expressão gênica foi realizada uma análise com um algoritmo conhecido como “figura de mérito” (FOM – “Figure Of Merit”). O algoritmo FOM é calculado considerando a variação média entre os valores de superexpressão e/ou subregulação de cada gene de um “cluster”. O operador indica, no programa, o número máximo de agrupamentos a serem calculados. O algoritmo divide, então, os genes em números crescentes de “clusters”, começando por um e chegando ao número máximo fornecido pelo operador, agrupando-os por suas semelhanças na variação de expressão. Em seguida, são calculadas as variações da expressão entre os genes que ficaram em cada agrupamento, e assim computadas as médias entre as variações de cada grupo, para cada situação (um grupo, dois grupos, três grupos, etc.). Com o aumento do número de “clusters”, a variação média de expressão entre os genes de cada um diminui. Estes dados são plotados em um gráfico com a média da variação de expressão entre os genes no eixo y e o número de “clusters” no eixo x. Cabe então ao operador selecionar o número ideal de grupos, a partir do qual a variação média na expressão entre os genes não diminui significativamente.

Determinado o número de “clusters”, os genes foram agrupados com o auxílio de algoritmos de clusterização hierárquica, como o “K-means”. Todos os “softwares” empregados nestes estudos, bem como detalhes referentes à sua utilização podem ser obtidos em <http://www.tigr.org/software>.

### 3.9 RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qPCR)

A fim de validar os dados obtidos nos experimentos de microarranjos de DNA, os mesmos foram comparados com os obtidos utilizando a técnica de qPCR. Para isso, as mesmas amostras de RNA purificado utilizadas para marcação e posterior hibridação, foram tratadas para a realização de RT-PCR.

Aproximadamente 3 µg de RNA total extraído e purificado dos tratamentos com agentes oxidantes e controles foram utilizados para sintetizar uma fita de cDNA acrescidos dos seguintes reagentes:

4 µL de oligo dT 100 pmol (5' GCGGCGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTT 3')

3 µg de RNA total

H<sub>2</sub>O MilliQ autoclavada (RNase “free”) q.s.p. 19 uL

O material foi então submetido ao aquecimento a 70° C por 5 minutos para desnaturação do RNA. Posteriormente, para anelamento dos iniciadores, a reação foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados:

6 µL de 5X First Strand Buffer (Invitrogen)

3 µL DTT (0,1 M)

0,6 µL dNTPs (25 mM de cada dNTP)

1 µL de Superscript II RT (200 U/µL – Invitrogen)

As reações foram então incubadas por 2 horas a 42° C, em seguida adicionou-se a cada reação 1 µL de RNase A (10 mg/mL) para degradar o RNA remanescente bem como o RNA molde, deixando-as por 30 minutos a 37° C. A purificação foi realizada em Microcon YM-30 (Millipore) e a quantificação em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000.

O qPCR foi então realizado para a confirmação de 12 genes modulados em resposta a Paraquat® e 8 modulados em resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reação foi montada da seguinte forma:

50 ng de cDNA de cada condição

50 nM de cada iniciador (“Forward” e “Reverse”)

10 µL de SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems)

20 µL de volume total

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

Para corrigir quantidades iniciais de cDNA, das diferentes amostras, foi utilizado como normalizador, um gene sem função conhecida, cuja sequência de nucleotídeos pode ser verificada em <http://143.107.203.68/marrayv2/miac.html> (MAC 0750) (NUNES *et al.*, 2005). A escolha deste gene foi devido a sua expressão constitutiva em todas as situações, que é caracterizada pela expressão deste gene, mas sem variação entre as diferentes situações analisadas. Su e colaboradores (2007) mostraram que a seleção de um gene como controle endógeno baseada nesta estratégia mostrou melhores resultados de correlação entre as técnicas, do que a escolha de um controle endógeno comumente usado, como o gene da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

### **3.10 ANÁLISE DAS RELAÇÕES ENTRE OS CONJUNTOS DE GENES MODULADOS EM RESPOSTA AOS GERADORES DE RADICAIS LIVRES**

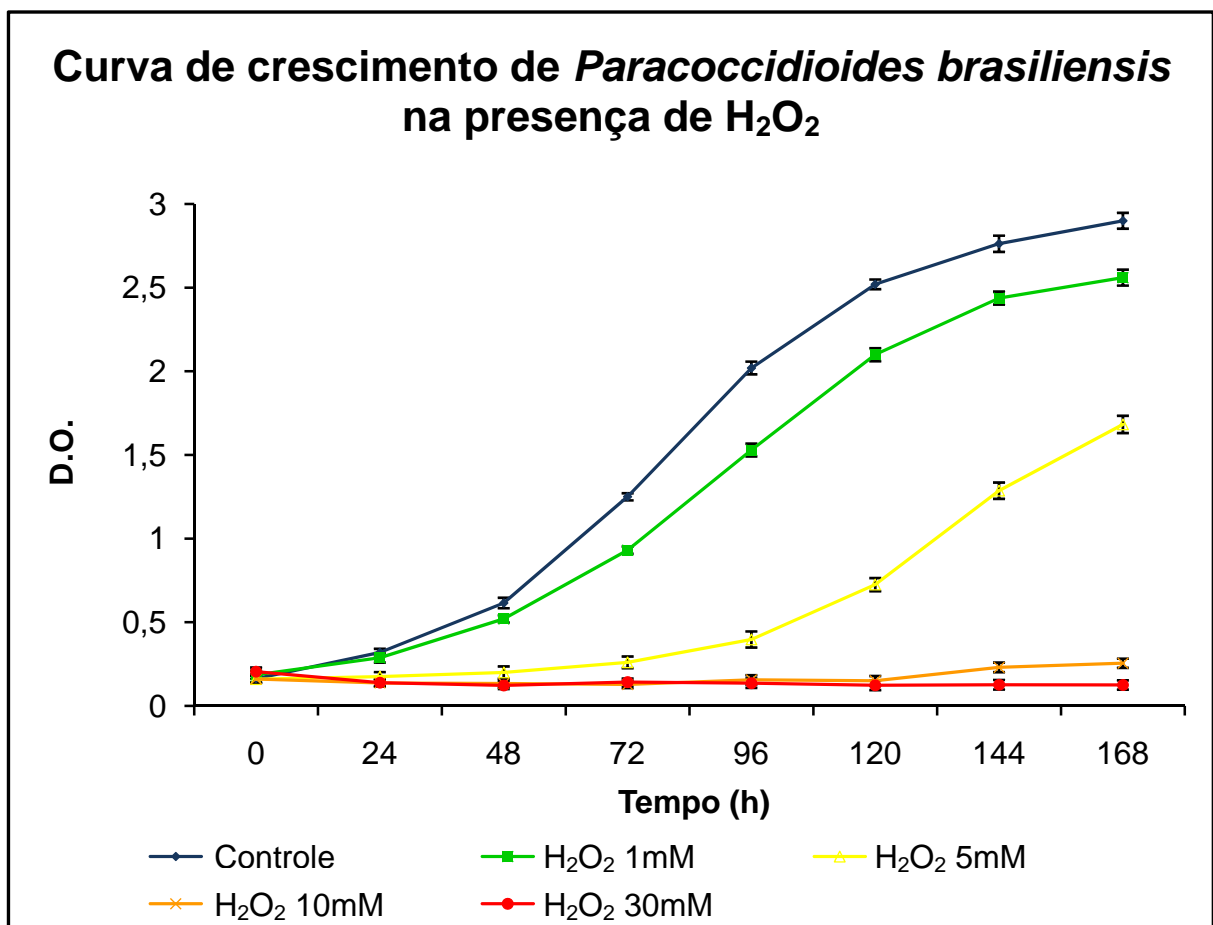
Para a montagem do diagrama foram adicionados ao programa os conjuntos de genes identificados em resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Paraquat<sup>®</sup>. Para uma análise mais ampla de genes responsivos a radicais livres foi adicionado também ao programa o conjunto de genes de *Paracoccidioides brasiliensis* que são modulados em resposta ao agente nitrosoativo GSNO. O perfil transcricional de resposta ao GSNO em *Paracoccidioides brasiliensis* foi obtido por Pimentel (2007), que utilizou a mesma plataforma de genes para realização da técnica de hibridação em microarranjos de DNA.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 RESPOSTA DE *Paracoccidioides brasiliensis* AO TRATAMENTO COM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### 4.1.1 CRESCIMENTO DO FUNGO NA PRESENÇA DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A fim de determinar as concentrações ideais para a exposição do *Paracoccidioides brasiliensis* ao peróxido de hidrogênio, curvas de sobrevivência do fungo foram realizadas na ausência (controle) e presença deste agente, que foi adicionado no tempo 0 (zero) nas concentrações de 1 mM, 5 mM, 10 mM e 30 mM (Figura 08). Os dados mostrados referem-se à média das triplicatas da cultura não tratada e tratada com cada concentração do agente oxidante.



**Figura 08:** Curvas de crescimento do *Paracoccidioides brasiliensis* em cultura, contendo apenas o meio de crescimento (controle) e acrescidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas concentrações de 1 mM, 5 mM, 10 mM e 30 mM.



Na figura 08, pode-se perceber que a exposição a 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levou a um pequeno atraso no crescimento do fungo, que atingiu sua fase estacionária de crescimento em uma D.O.<sub>600</sub> pouco menor que a da cultura controle. Quando expostas a 5 mM do mesmo agente as leveduras apresentaram um atraso de 72 horas no crescimento em relação à cultura controle, sem atingir a fase estacionária no período de mensuração. No entanto as concentrações de 10 mM e 30 mM foram capazes de inibir totalmente o crescimento do fungo e por este motivo, estas duas últimas não foram utilizadas nos experimentos de hibridação em microarranjos de DNA.

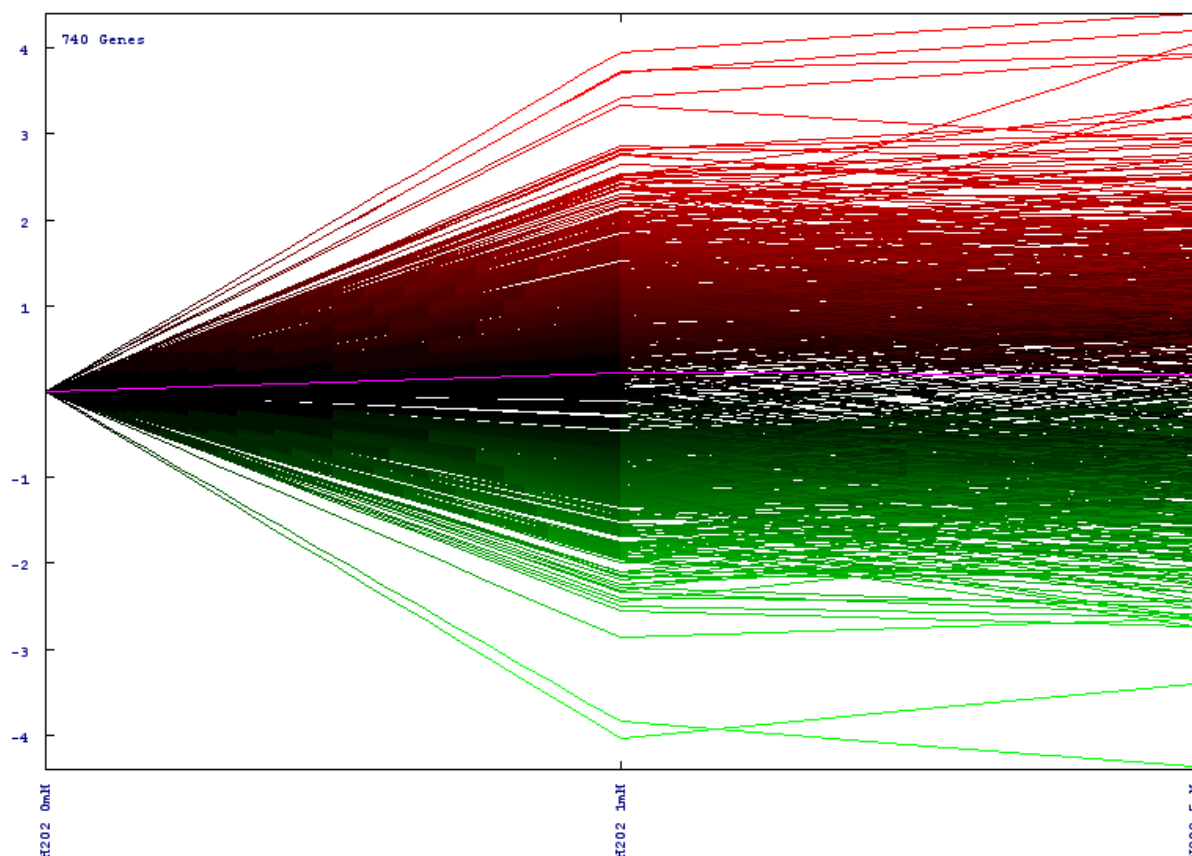
#### 4.1.2 HIBRIDAÇÃO EM MICROARRANJOS DE DNA

A partir dos dados obtidos, leveduras de *P. brasiliensis* foram cultivadas em meio YPD líquido até atingir uma D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 2,0, sendo esta cultura, então, dividida em 3 partes iguais. A primeira parte não foi exposta ao agente oxidante, servindo como controle, enquanto as outras duas foram expostas às concentrações finais de 1 mM e 5 mM, respectivamente, por um período de 5 horas (conforme item 3.3 Exposição a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ao final do tempo determinado as células foram separadas do meio de cultura por filtração a vácuo e seu RNA foi extraído (conforme item 3.5 Extração de RNA).

Para cada cultura exposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram realizadas duas marcações, com inversão dos fluoróforos, com posterior hibridação nos “chips”, conforme descrito nos itens 3.6 e 3.7 do Método. Após lavagem e secagem das lâminas e posterior aquisição de imagens, os resultados foram analisados e os genes com variação estatisticamente significativa de expressão foram separados dos com variação estatisticamente não significativa.

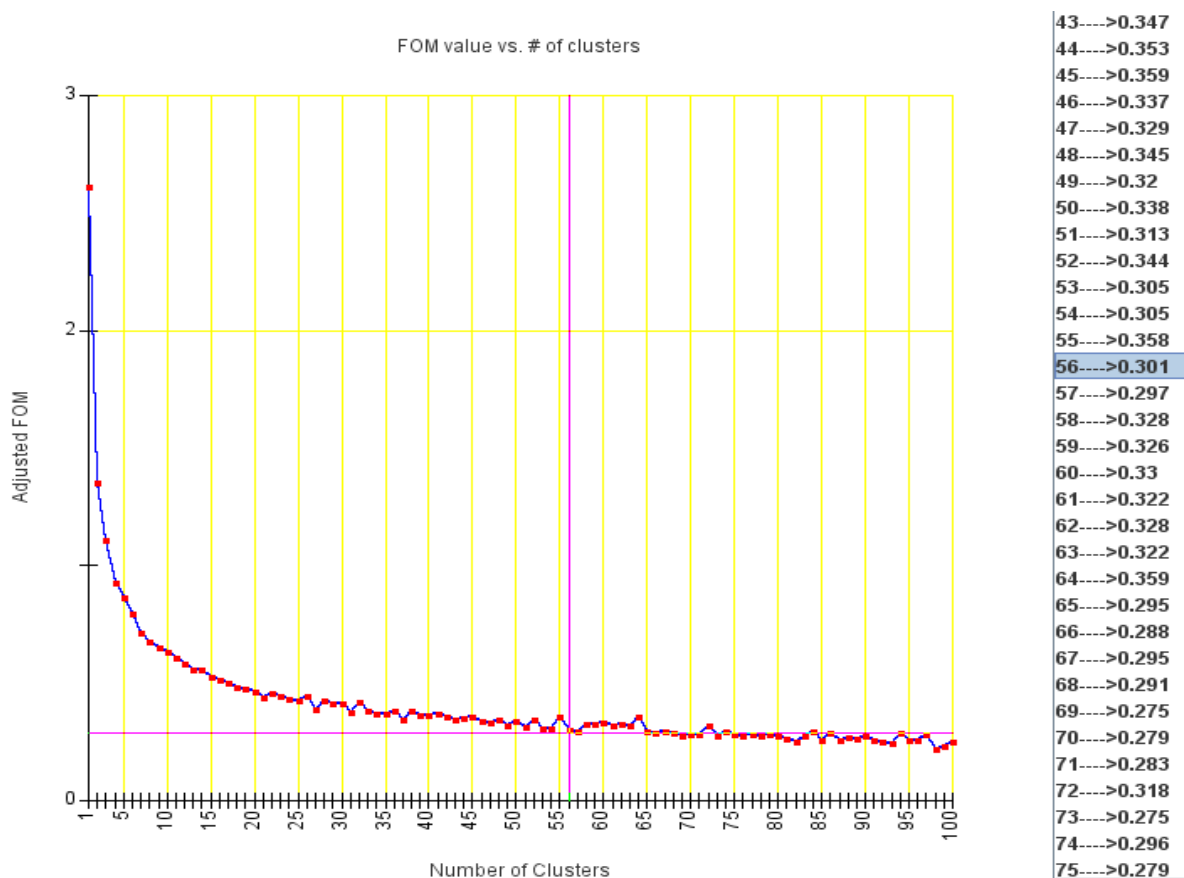
O perfil de expressão dos genes com modulação estatisticamente significativa é mostrado na figura 09, onde cada linha representa a variação média na expressão de um gene. O valor de expressão dos genes em resposta às diferentes concentrações é mostrado em função do logaritmo na base 2 da razão média das intensidades de fluorescências entre Cy5 e Cy3, plotada no eixo y, enquanto as concentrações do agente oxidante são plotadas no eixo x. As diferentes réplicas dos experimentos são normalizadas para que a intensidade de fluorescência em Cy3 corresponda às amostras não tratadas (controles) e a intensidade de Cy5, às amostras tratadas com o agente oxidante. Dessa forma, quando o resultado do logaritmo é menor do que zero (Cy3>Cy5), indicando um gene com sua expressão diminuída (ou subregulada) pelo tratamento, a sua linha representativa é da cor verde, sendo esta mais intensa, quanto maior for a subregulação deste gene; quando o logaritmo é maior do que zero

(Cy3<Cy5), indicando um gene com sua expressão aumentada (ou superexpresso) a cor é vermelha, aumentando de intensidade proporcionalmente ao aumento da superexpressão do gene. A análise mostrou que 740 genes responderam de forma estatisticamente significativa ao tratamento com peróxido de hidrogênio, mostrando um perfil homogêneo de distribuição dos genes entre superexpressos e subregulados (Figura 09).



**Figura 09:** Representação de 740 genes, com variação na expressão estatisticamente significativa, identificados durante exposição a duas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM e 5 mM). No eixo y a escala mostra o logaritmo na base 2 da razão da expressão dos genes na cultura tratada e controle; no eixo x, são mostradas as diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os dados inseridos são as médias estatísticas das réplicas de cada experimento após análise ANOVA (p=0,01). Cada linha representa a variação média na expressão de um gene presente no chip.

A determinação do número ideal de “clusters”, que permitiria a visualização dos diferentes padrões básicos de expressão gênica contidos na figura 09, foi realizada com o auxílio do algoritmo conhecido como “figura de mérito” (FOM – “**F**igure **O**f **M**erit”). Os resultados deste algoritmo foram inseridos em um gráfico, com a média da variação de expressão entre os genes no eixo y (valor de FOM) e o número de “clusters” no eixo x (Figura 10). De acordo com os critérios estabelecidos (ver item 3.8 Aquisição e Análise de Imagens), o número de grupos escolhido foi 56. A intersecção entre o valor de FOM e 56 grupos é mostrada por duas linhas em rosa na figura 10.



**Figura 10:** Gráfico gerado pelo algoritmo FOM para os genes estatisticamente significativos expressos durante a exposição a peróxido de hidrogênio. O valor no plotado no eixo y é a média entre as variações de expressão dos genes alocados em cada “cluster”. No eixo x, temos o número de “clusters” de 1 a 100 (número máximo informado pelo operador). Na coluna, à direita, é apresentada uma lista com os números de “clusters” em ordem crescente, e o valor médio obtido da variação de expressão entre os genes de cada um. Em destaque, na coluna, o número de “clusters” selecionado pelo operador e seu valor de FOM, mostrado no gráfico pelo cruzamento das linhas em rosa.

#### 4.1.3 AGRUPAMENTO DOS GENES PELO PERFIL DE EXPRESSÃO

Os 56 grupos de genes modulados em resposta a diferentes concentrações de  $H_2O_2$  são mostrados na figura 11, onde os dados dos genes com variação estatisticamente significativa na expressão foram agrupados de acordo com o seu perfil de resposta utilizando um algoritmo de “K-means”, gerando “clusters” ou grupos com padrões de resposta semelhantes entre seus integrantes. Cada grupo aparece em um gráfico, onde cada linha representa a variação média na expressão de um gene da mesma forma que na figura 09, aqui também mostrando no eixo y o logaritmo na base 2 da razão da expressão dos genes na cultura tratada e controle e no eixo x, as diferentes concentrações de  $H_2O_2$ . Na parte inferior direita do gráfico aparece o número daquele grupo enquanto o número de genes de cada grupo é destacado em azul na parte superior. Foram selecionados 6 grupos que apresentaram os

maiores aumentos e diminuições na expressão dos genes, ou que continham genes diretamente ligados a situação de estresse oxidativo.



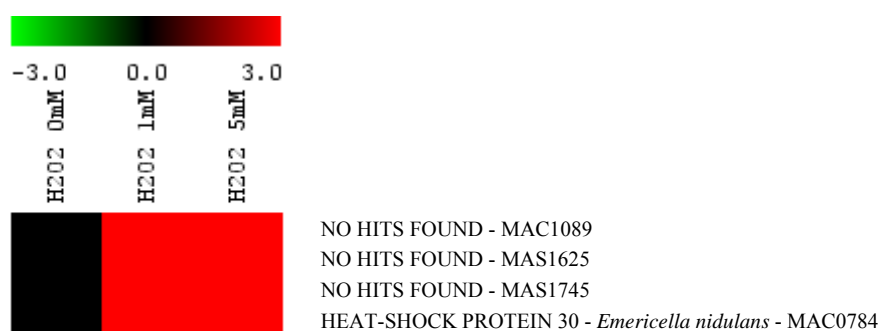
**Figura 11:** Agrupamentos de 740 genes com variação estatisticamente significativa, totalizando 56 “clusters”. Cada “cluster” é formado por genes com variações semelhantes na expressão, em exposição a diferentes concentrações de  $H_2O_2$ . A disposição dos experimentos foi feita da seguinte forma: no eixo y a escala mostra a variação para cada “cluster” do logaritmo na base 2 da razão da expressão dos genes na cultura tratada e controle; no ponto inicial do eixo x, são colocados os dados de  $H_2O_2$  0 mM, seguidos pelos de 1 mM, 5 mM. Destacados por quadros vermelhos, 6 “clusters” que serão analisados individualmente. A numeração na parte inferior direita indica a ordem de cada “cluster”.

Os “clusters” podem também ser analisados individualmente, por meio de outro tipo de tratamento de dados, onde podemos visualizar o perfil de expressão e o nome do gene. Os grupos destacados por quadros vermelhos na figura 11 podem ser vistos desta forma nas figuras 12 a 17. Na parte superior da figura é possível observar a escala de cores e intensidades usada, onde o número “-3.0” representa o resultado do logaritmo de base 2 da razão da expressão dos genes na cultura tratada e controle, e assim, a expressão na tratada seria oito vezes menor do que a expressão no controle ( $2^{-3}$ ); da mesma forma o número “3.0” representa o resultado do mesmo logaritmo e, portanto, expressão na tratada oito vezes maior do que a expressão no controle ( $2^3$ ).

A coluna “0 mM  $H_2O_2$ ” representa a igualdade da expressão dos genes na cultura tratada e controle e, portanto o resultado do logaritmo da razão entre eles é zero (0.0),

apresentado na cor preta. Nestas figuras podem ser vistas breves descrições de seqüências expressas de cDNA presentes no “chip”. Quando estas ainda não possuem uma função determinada os descritores aparecem como “*No hits found*”, o que significa que quando comparada a um banco de dados através da ferramenta BLAST, a seqüência não possui similaridade significativa com qualquer informação já depositada no banco de dados do GenBank – NCBI, uma coleção anotada de todas seqüências públicas de DNA. Quando a EST comparada ao banco de dados possui similaridade com informações depositadas, o nome descrito neste banco é mostrado na figura (NCBI, 2008). Em seguida ao nome do gene está descrito o código de acesso à sua seqüência de DNA, que pode ser obtida em [http://143.107.203.68/marrayv2/mia\\_cs.html](http://143.107.203.68/marrayv2/mia_cs.html) (NUNES *et al.*, 2005).

Os clusters 5, 9 e 52 mostram agrupamentos de genes que tiveram sua expressão semelhantemente aumentada em resposta a tratamentos com peróxido de hidrogênio e serão descritos com mais detalhes.

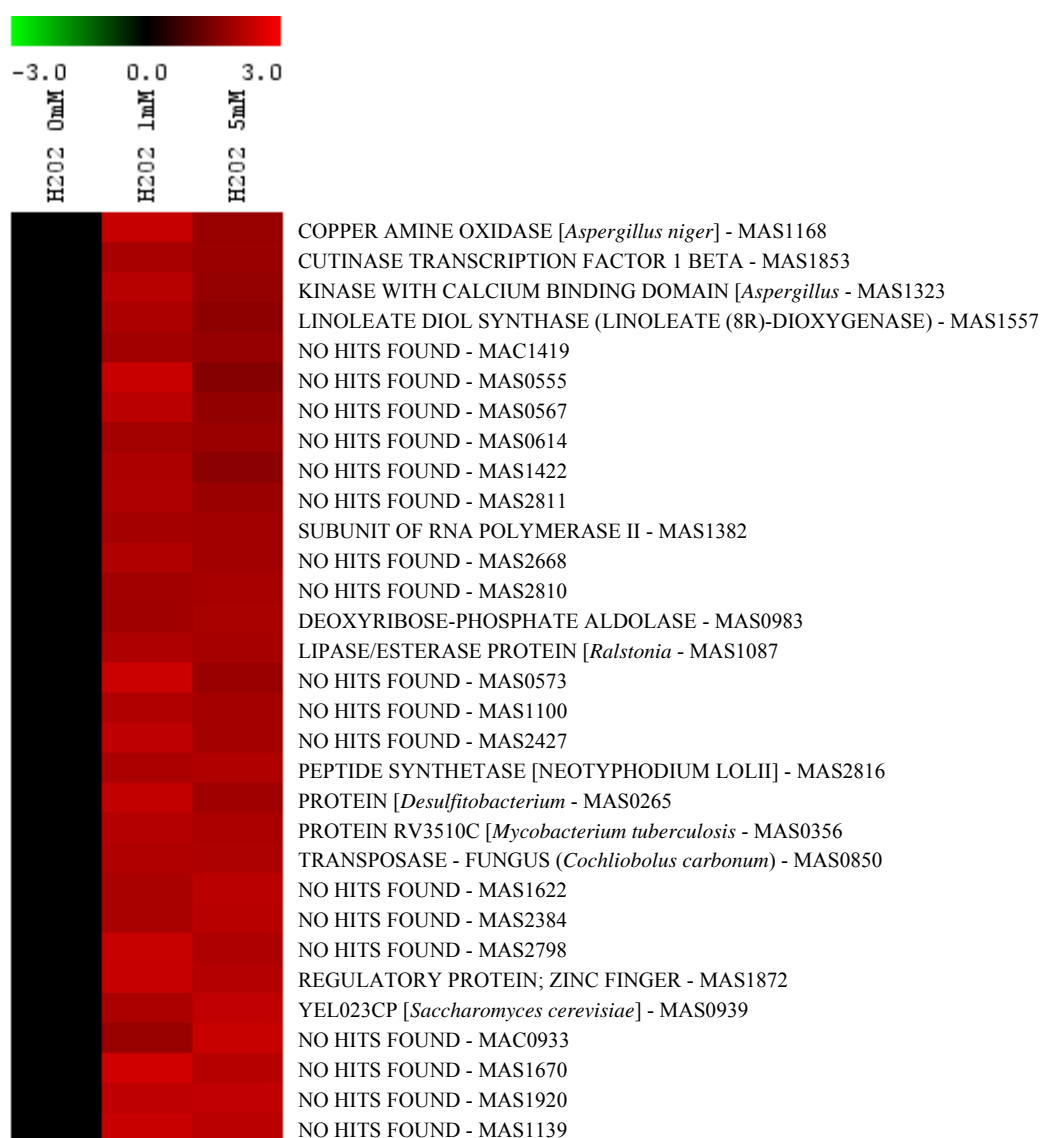


**Figura 12:** “Cluster” 05, destacado em vermelho na figura 11. É possível observar 3 genes sem função conhecida (*No hits found*), e um gene da proteína de “heat-shock” 30 (MAC0784). Suas expressões estão bastante aumentadas (mais de 8 vezes) após tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

No “cluster” 05 (Figura 12) podem ser vistos 4 ESTs, sendo que os três primeiros não apresentam função conhecida ou homologia a nenhuma informação do banco de dados e o quarto pode ser descrito como o gene de uma proteína de “heat shock” (HSP) com 30 kDa, descrita com maior semelhança na seqüência de nucleotídeos em *Emericella nidulans* (MAC0794). Os genes deste grupo apresentam aumento maior que 8 vezes na sua expressão em resposta à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> representada pela cor vermelho intenso na figura.

Na figura 13 (“cluster” 09) podemos observar que dos 31 ESTs com modulação significativa em resposta à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 18 são descritos como sem função conhecida. No entanto é possível destacar alguns genes importantes, como o da enzima cobre amino oxidase (MAS1168) e da desoxirribose-fosfato aldolase (MAS0983). Proteínas envolvidas em regulação e expressão de ácidos nucléicos também podem ser observadas, como o fator de

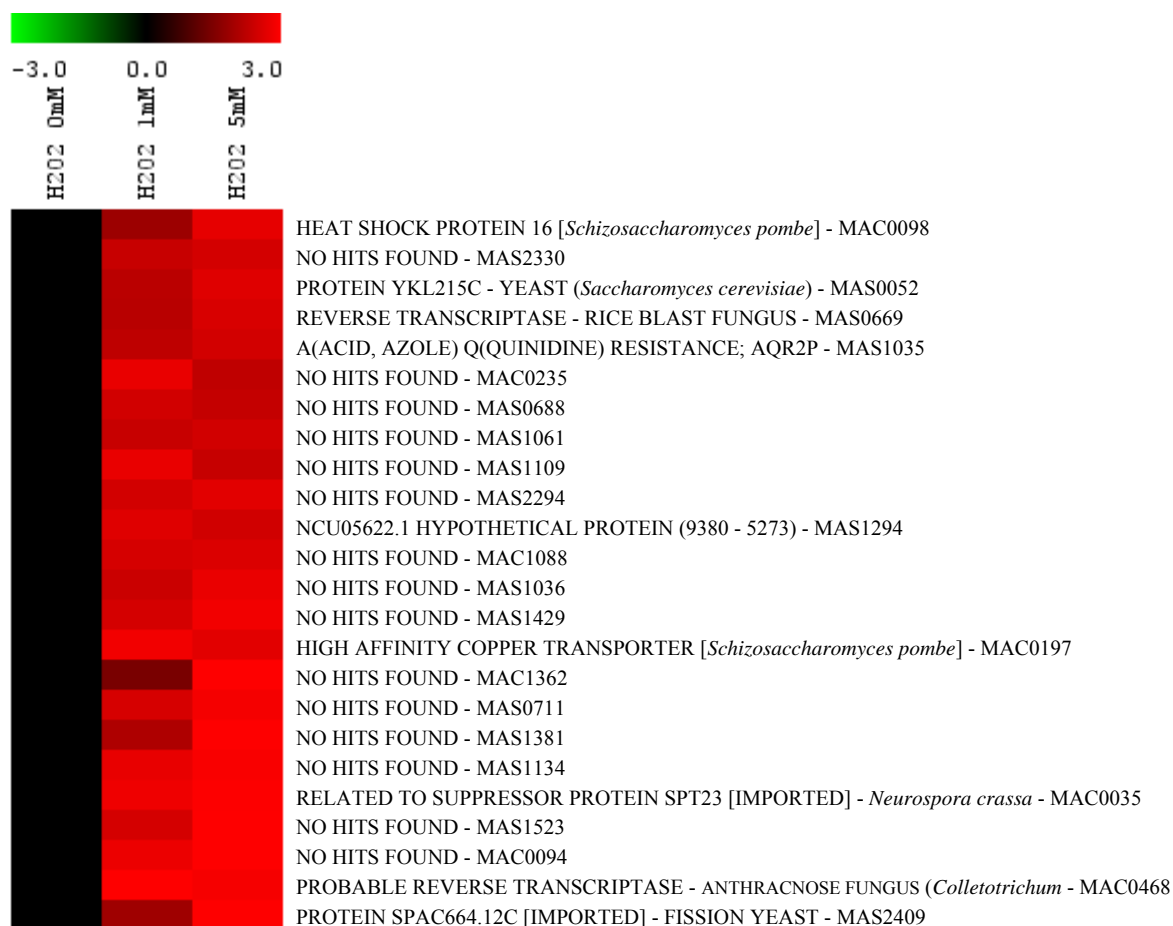
transcrição 1 de cutinase (MAS1853), uma subunidade da RNA polimerase II (MAS1382), uma peptídeo sintase (MAS2816), uma transposase de fungo (MAS0850) e um proteína regulatória de “zinc finger” (MAS1872) Com atualizações do banco de dados foi possível identificar um gene descrito anteriormente com sem função conhecida (MAS0567) e que atualmente é descrito como semelhante a genes da família de enzimas epimerases-desidratases. O padrão de resposta deste “cluster” mostra aumento na expressão em resposta às duas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 13:** “Cluster” 09, destacado em vermelho na figura 11. Aqui aparecem 18 genes sem função conhecida (*No hits found*) de um total de 31 suas expressões estão aumentadas nos tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

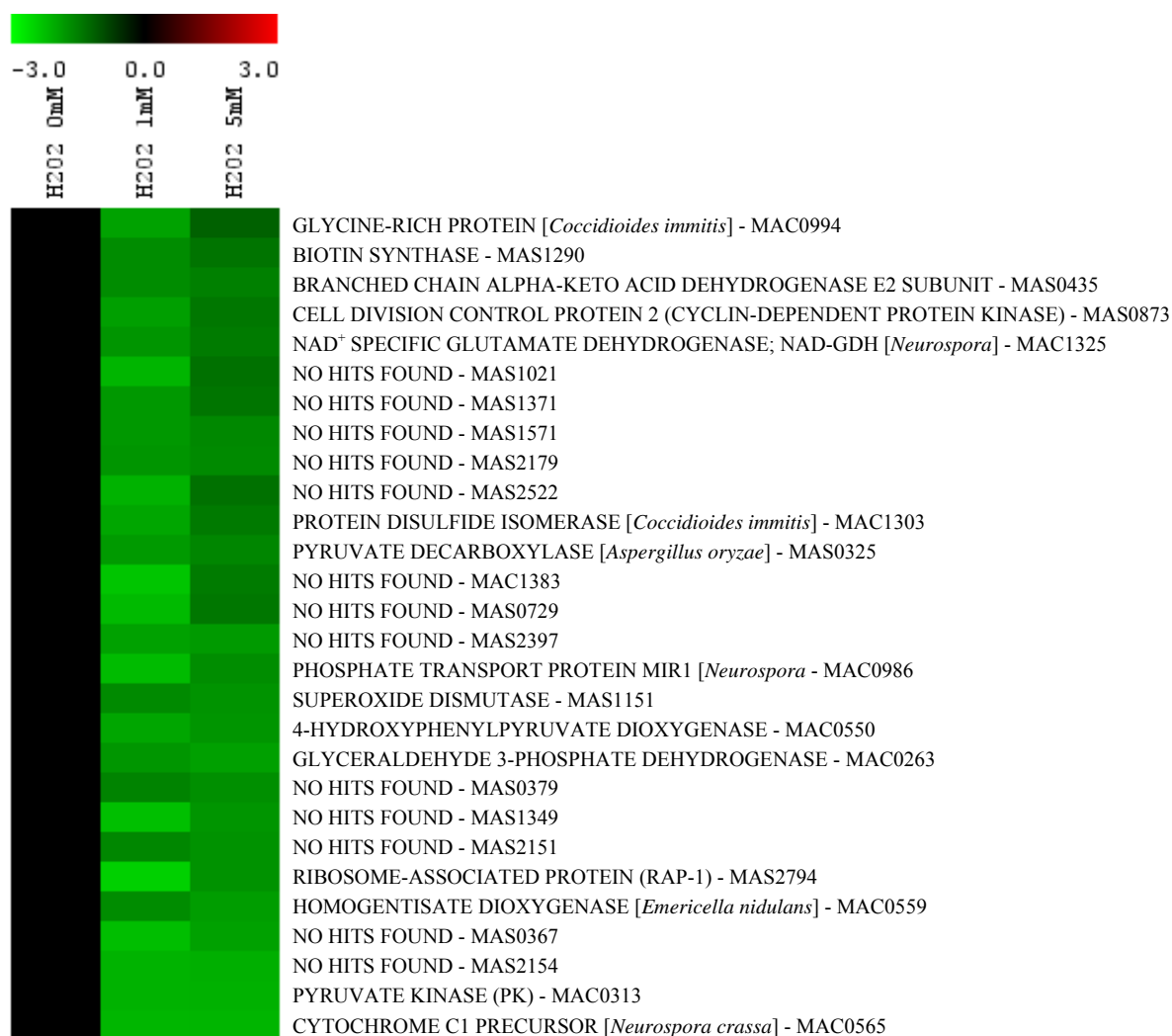
Na figura 14 (“cluster” 52) verifica-se igualmente superexpressão dos genes em resposta à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e também é composto por grande quantidade de genes sem função conhecida (14 do total de 24). Aqui também é possível destacar o gene da HSP de 16 kDa (MAC0098)

que apresenta um padrão compatível com o mostrado pela HSP 30 (Figura 12) e o gene de uma proteína transportadora de cobre com alta afinidade (MAC0197).



**Figura 14:** “Cluster” 52, destacado em vermelho na figura 11. Dos 24 genes apresentados, 14 não têm função conhecida (*No hits found*). Suas expressões estão aumentadas nos tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

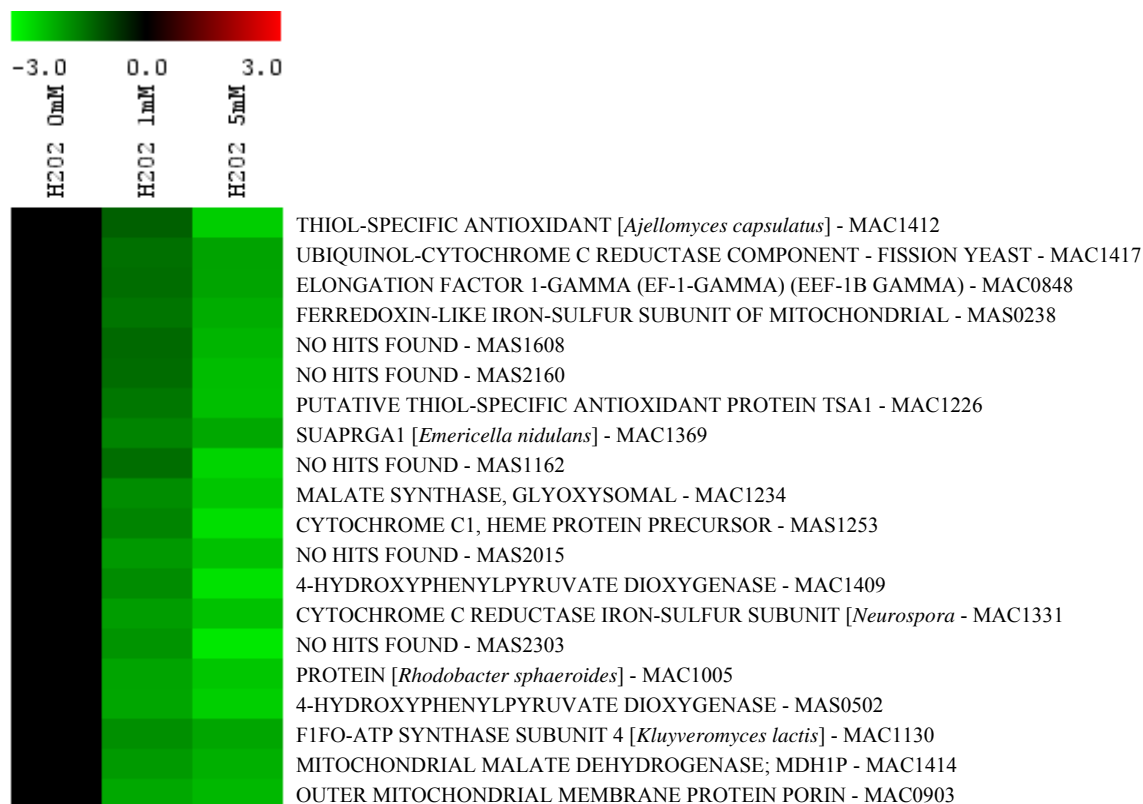
Nas figuras 15, 16 e 17 podem ser vistos os genes com modulações negativas em resposta à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No grupo 13 (Figura 15) novamente uma grande parte dos genes apresentados não tem função conhecida (*No hits found*), 13 do total de 28. Daqueles com função conhecida poder ser destacados os das enzimas biotina sintase (MAS1290), glutamato desidrogenase (MAS1325) superóxido dismutase de ferro (Fe-SOD) (MAS1151), 4-hidroxifenil piruvato desidrogenase (4HPPD) (MAC0550), homogentisato deoxigenase (MAC0559). Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (MAC0263), NAD<sup>+</sup> glutamato desidrogenase e piruvato decarboxilase (MAS0325) também se encontram agrupados neste “cluster”.



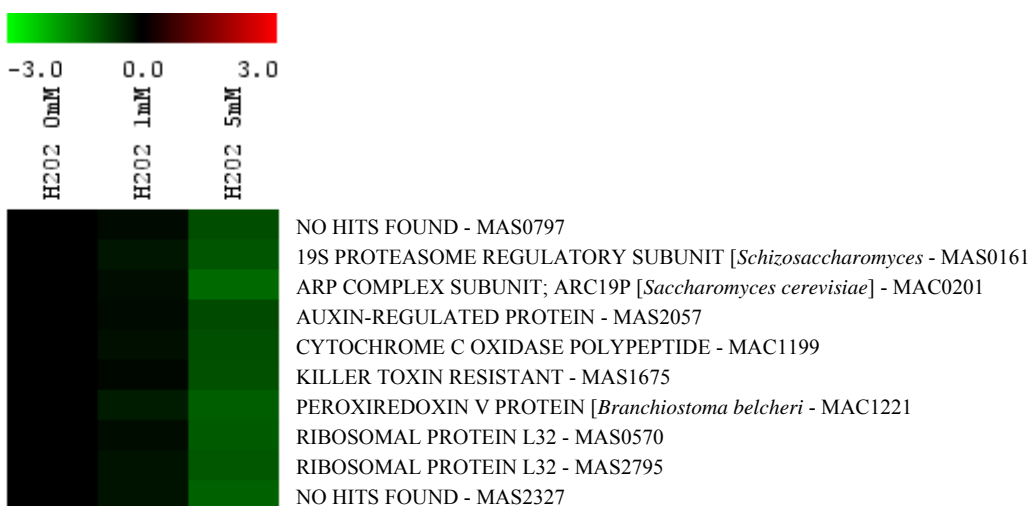
**Figura 15:** “Cluster” 13, destacado em vermelho na figura 11, que apresenta 13 genes sem função conhecida (*No hits found*) (de um total de 28). Suas expressões estão diminuídas nos tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

No “cluster” 34 (Figura 16) o número de genes sem função conhecida é baixo (5 do total de 20) e nele podem ser destacados genes das enzimas antioxidantes tiol específicas (MAS1412 e MAC1226), um componente da ubiquinol citocromo C redutase (MAC1417), ferrodixina mitocondrial (subunidade ferro-enxofre) (MAS0238), subunidade Fe-S da citocromo C redutase (MAC1331), subunidade 4 da FoF<sub>1</sub>ATP sintase (MAC1130) e malato desidrogenase mitocondrial (MAC1414); também podem ser vistos os genes de 4HPPD (MAS0502 e MAC1409) com a expressão semelhante ao visto na figura 15. Na figura 17 (“cluster” 37) os genes de duas enzimas merecem destaque, são citocromo C oxidase (MAC1199) e peroxirredoxina V (MAC1221).





**Figura 16:** “Cluster” 34, destacado em vermelho na figura 11, que apresenta 5 genes sem função conhecida (*No hits found*), e outros 15 já descritos. Suas expressões estão diminuídas nos tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

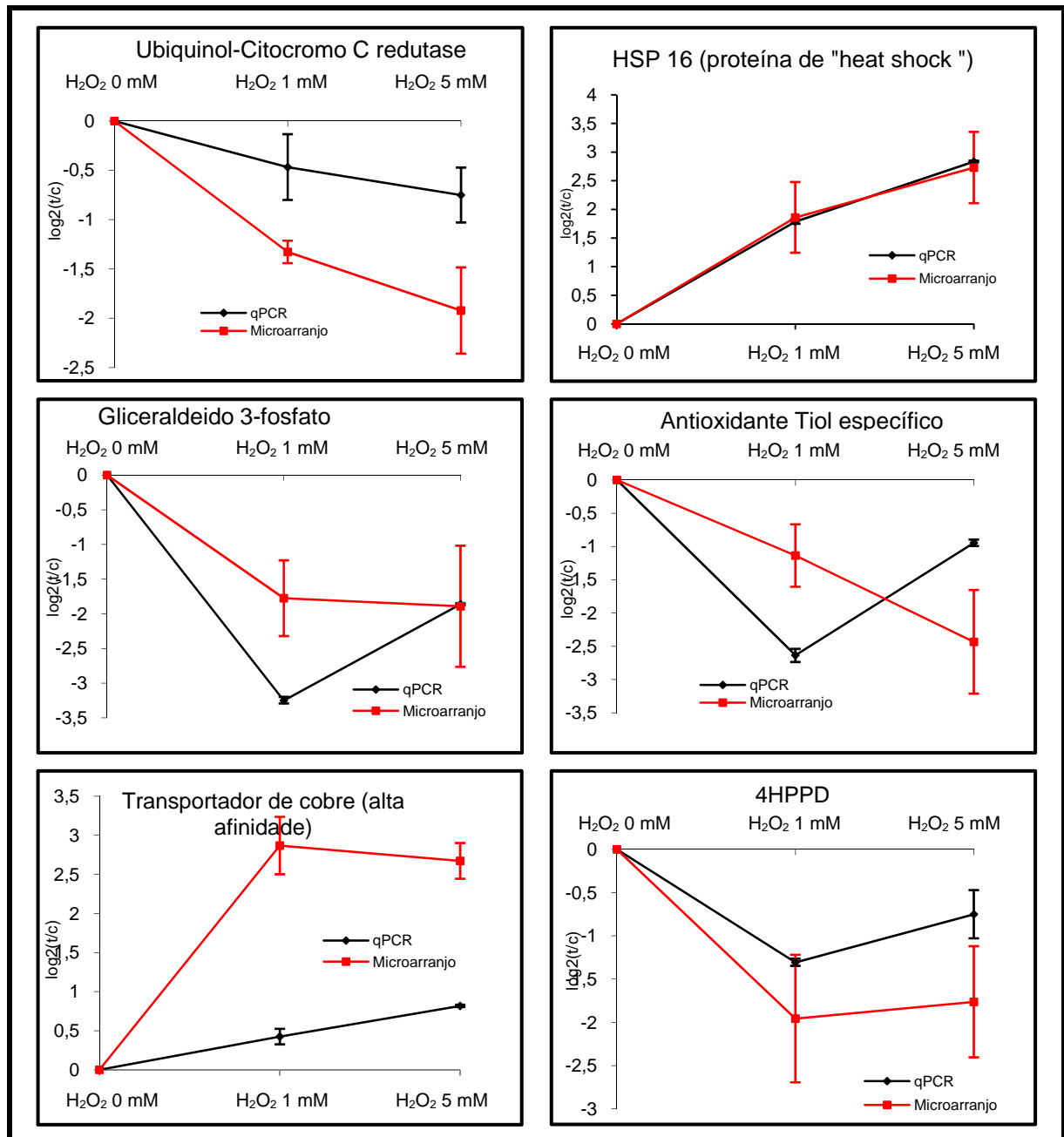


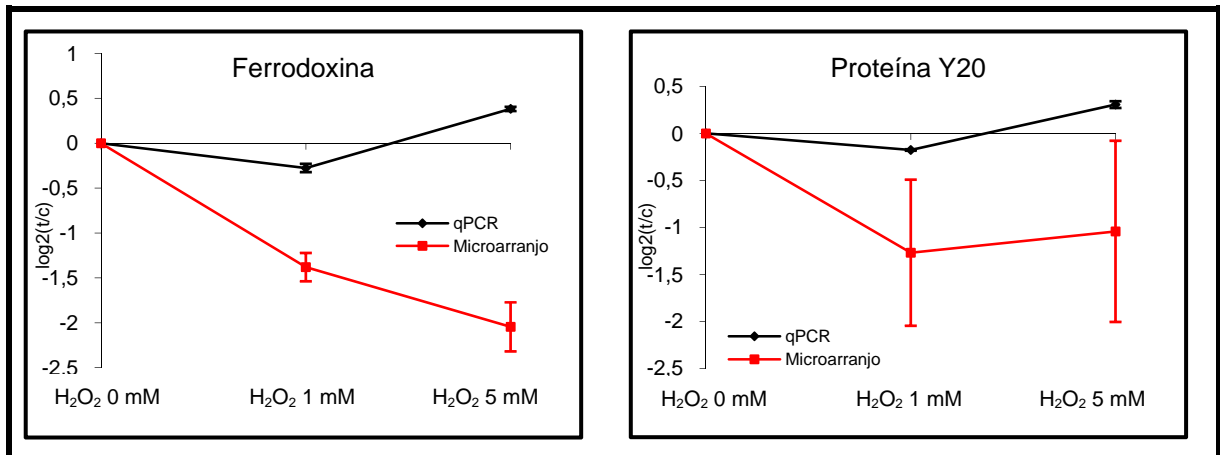
**Figura 17:** “Cluster” 37, destacado em vermelho na figura 11. Aqui aparecem 2 genes sem função conhecida (*No hits found*). Suas expressões estão diminuídas nos tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 4.1.4 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE HIBRIDAÇÃO POR qPCR

Para confirmação dos resultados de hibridação em microarranjos de DNA pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR), 8 genes que pudessem ter sua atividade relacionada ao estresse oxidativo foram selecionados (as seqüências dos “primers” utilizados para amplificação de cada gene podem ser vistas no Anexo I). Os dados obtidos foram

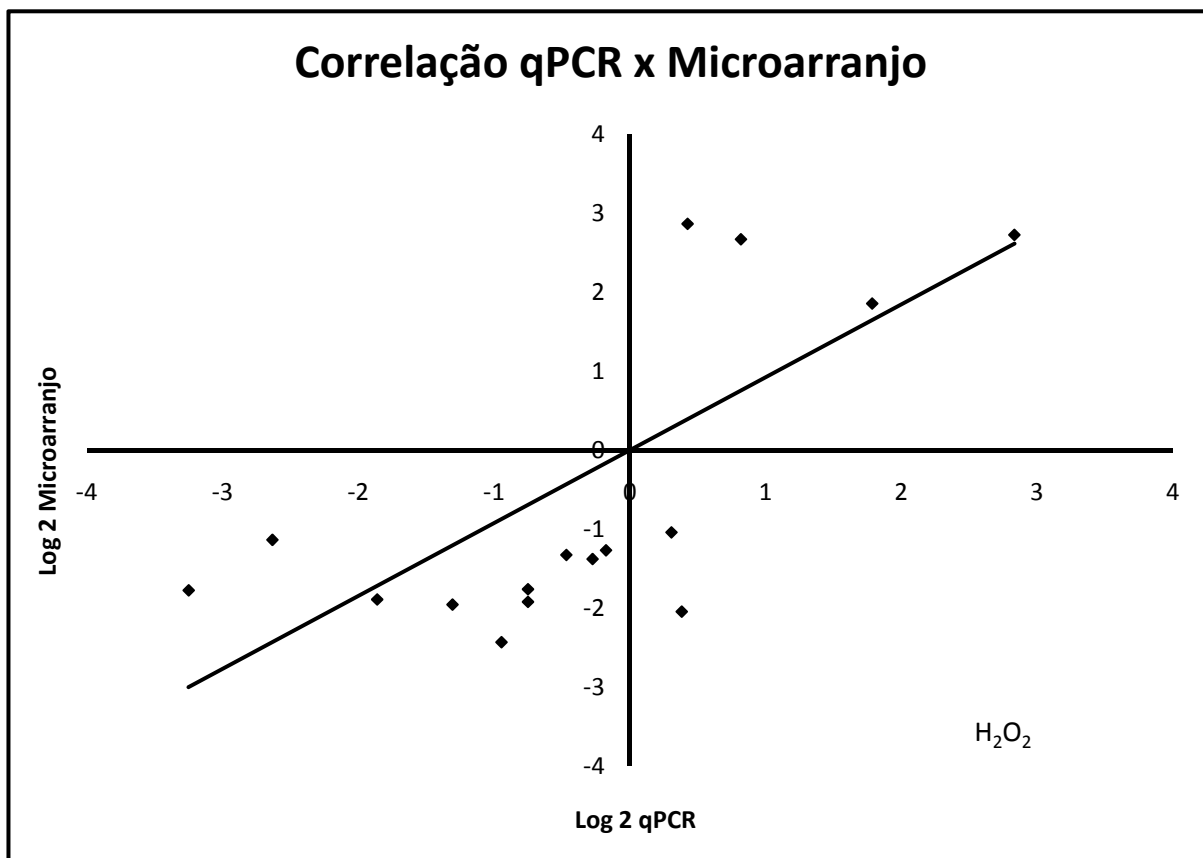
plotados em gráficos que podem ser vistos na figura 18. No eixo X estão colocadas as diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio utilizadas nos experimentos e no eixo Y o logaritmo na base 2 da razão entre a expressão do gene na cultura tratada (t) e sua expressão na cultura controle (c). As barras de erro representam o desvio padrão de cada experimento calculado para três réplicas de qPCR e quatro de hibridação em microarranjos de DNA.





**Figura 18:** Comparação dos dados obtidos nas hibridações em microarranjos de DNA por qPCR. São mostrados 8 genes (ubiquinol citocromo C redutase – MAC1417, proteína de “heat shock” HSP 16 – MAC0098, antioxidante tiol específico – MA1226, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase – MAC026, 4HPPD – MAC0550, transportador de cobre de alta afinidade – MAC0197, ferredoxina mitocondrial – MAS0238, proteína Y20 de *Paracoccidioides brasiliensis* – MAC1168) com modulação estatisticamente significativa na expressão. No eixo X estão colocadas as diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio utilizadas nos experimentos e no eixo Y o logaritmo na base 2 da razão entre a expressão do gene na cultura tratada (t) e sua expressão na cultura controle (c). As linhas pretas referem-se aos dados de qPCR, enquanto as vermelhas aos dados de hibridação em microarranjos de DNA. As barras de erro representam o desvio padrão de cada experimento calculado para três réplicas de qPCR e quatro de hibridação em microarranjos de DNA.

Os dados obtidos na confirmação foram então plotados em um gráfico para demonstrar correlação entre as técnicas (Figura 19). No eixo X foram colocados os dados de logaritmo na base 2 da razão entre a expressão do gene na cultura tratada com peróxido de hidrogênio e sua expressão na cultura controle obtida nos experimentos de qPCR. No eixo Y foram colocados dados de logaritmo na base 2 da razão entre a expressão do gene na cultura tratada com peróxido de hidrogênio e sua expressão na cultura controle obtida nos experimentos de hibridação em microarranjos de DNA. A linha de tendência é traçada de acordo com os valores plotados como uma reta média entre os dados.



**Figura 19:** Correlação entre os dados obtidos nas hibridações em microarranjos de DNA e qPCR. No eixo X foram colocados os dados de logaritmo na base 2 da razão entre a expressão do gene na cultura tratada com peróxido de hidrogênio e sua expressão na cultura controle obtida nos experimentos de qPCR. No eixo Y foram colocados dados de logaritmo na base 2 da razão entre a expressão do gene na cultura tratada com peróxido de hidrogênio e sua expressão na cultura controle obtida nos experimentos de hibridação em microarranjos de DNA. A linha de tendência é traçada de acordo com os valores plotados como uma reta média entre os dados.

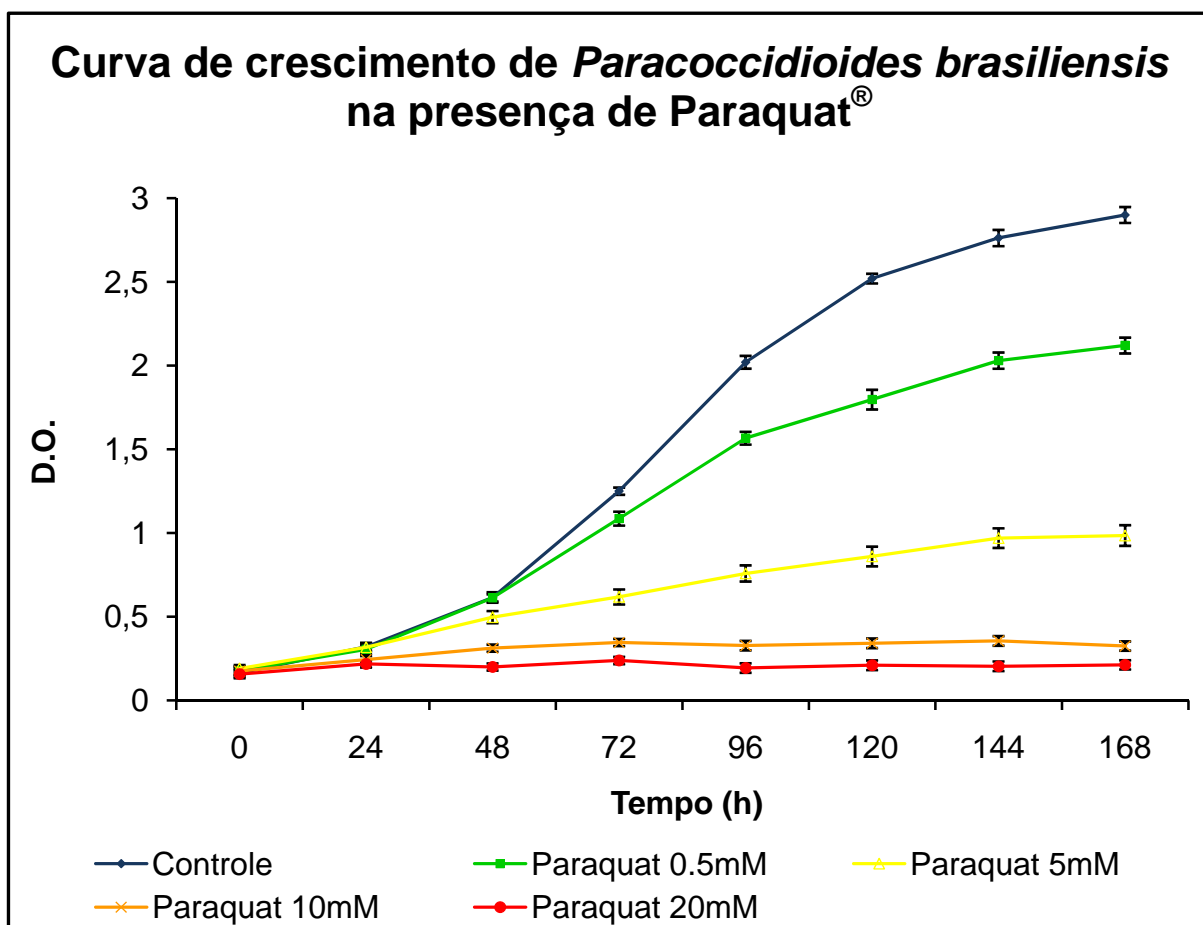
O coeficiente de Correlação de Pearson calculado para os dados foi de 0,6999. No entanto, se o gráfico for observado qualitativamente (relacionando apenas o aumento ou diminuição da expressão dos genes nas duas técnicas), é possível ver que 87,5 % dos dados são coincidentes.

## 4.2 RESPOSTA DE *Paracoccidioides brasiliensis* AO TRATAMENTO COM PARAQUAT<sup>®</sup>

### 4.2.1 CRESCIMENTO DO FUNGO NA PRESENÇA DE PARAQUAT<sup>®</sup>

Da mesma forma como no experimento com o agente oxidante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, culturas de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* foram acompanhadas em relação ao seu crescimento na presença de Paraquat<sup>®</sup> (Figura 20). Paraquat<sup>®</sup> é um reconhecido gerador de radicais superóxido. Para isto observou-se o crescimento (medida de turbidez a 600 nm) na ausência (controle) e presença deste agente, que foi adicionado no tempo 0 (zero) nas

concentrações de 0,5 mM, 5 mM, 10 mM e 20 mM. Os dados mostrados referem-se à média das triplicatas da cultura não tratada e tratada com cada concentração do agente oxidante.



**Figura 20:** Curvas de crescimento do *Paracoccidioides brasiliensis* em culturas contendo apenas o meio de crescimento (controle) e acrescidas de Paraquat® nas concentrações de 0,5 mM, 5 mM, 10 mM e 20 mM.

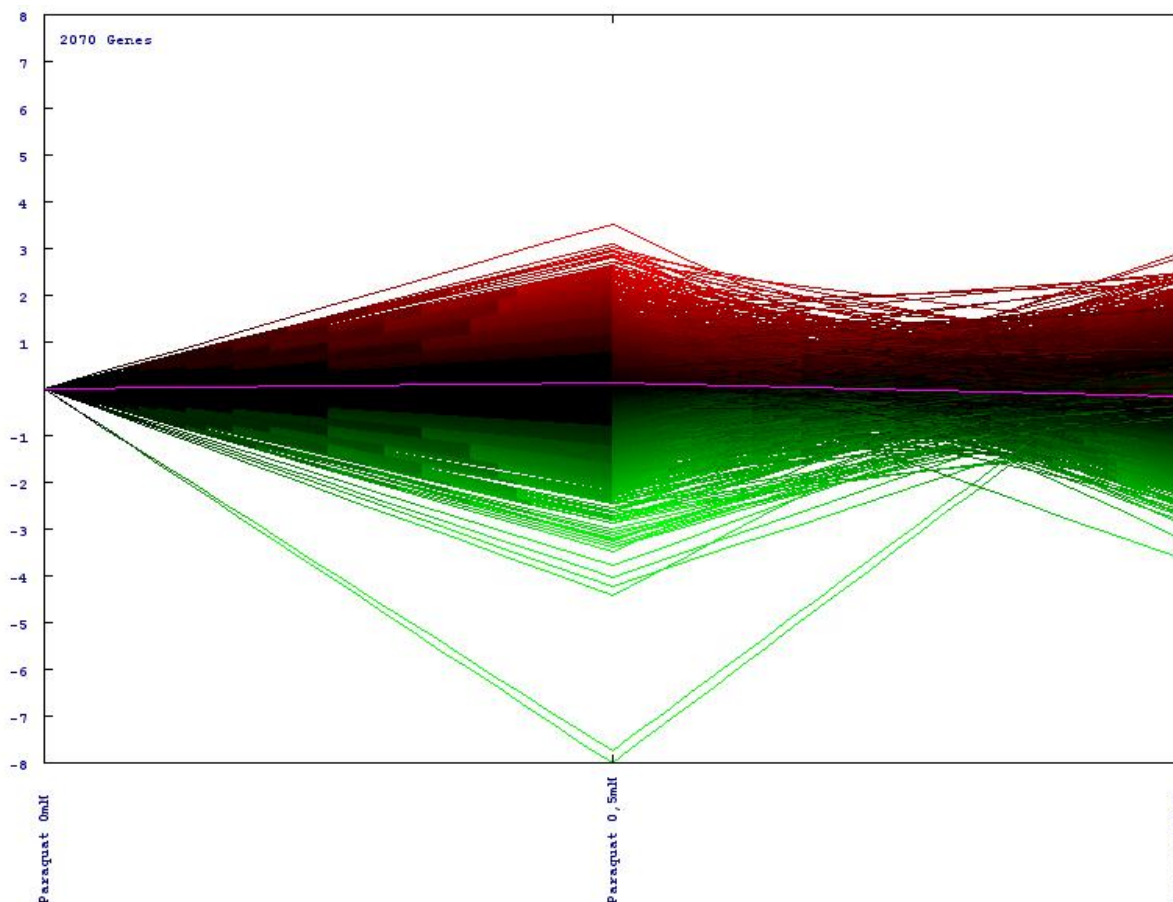
Na figura 20, pode-se observar que a exposição a 0,5 mM de Paraquat® levou a um atraso no crescimento do fungo que atingiu sua fase estacionária de crescimento em uma D.O.<sub>600</sub> menor que a da cultura controle. Quando expostas a 5 mM do mesmo agente, as leveduras apresentaram um retardo maior no crescimento em relação à cultura controle, atingindo a fase estacionária com um terço da D.O.<sub>600</sub> atingida pela cultura controle. No entanto as concentrações de 10 mM e 20 mM mostraram inibição total do crescimento do fungo e por este motivo, estas duas últimas não foram utilizadas nos experimentos de hibridação em microarranjos de DNA.

#### 4.2.2 HIBRIDAÇÃO EM MICROARRANJOS DE DNA

A partir dos dados obtidos, leveduras de *P. brasiliensis* foram cultivadas em meio YPD líquido até atingir uma D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 2,0, sendo esta cultura, então, dividida em 3 partes iguais. A primeira parte não foi exposta ao agente oxidante, servindo como controle, enquanto as outras duas foram expostas às concentrações de 0,5 mM e 5 mM, respectivamente, por um período de 5 horas (conforme item 3.4 Exposição ao Paraquat<sup>®</sup>). Ao final do tempo determinado, as células foram separadas do meio de cultura por filtração a vácuo e o RNA total das células foi extraído (conforme item 3.5).

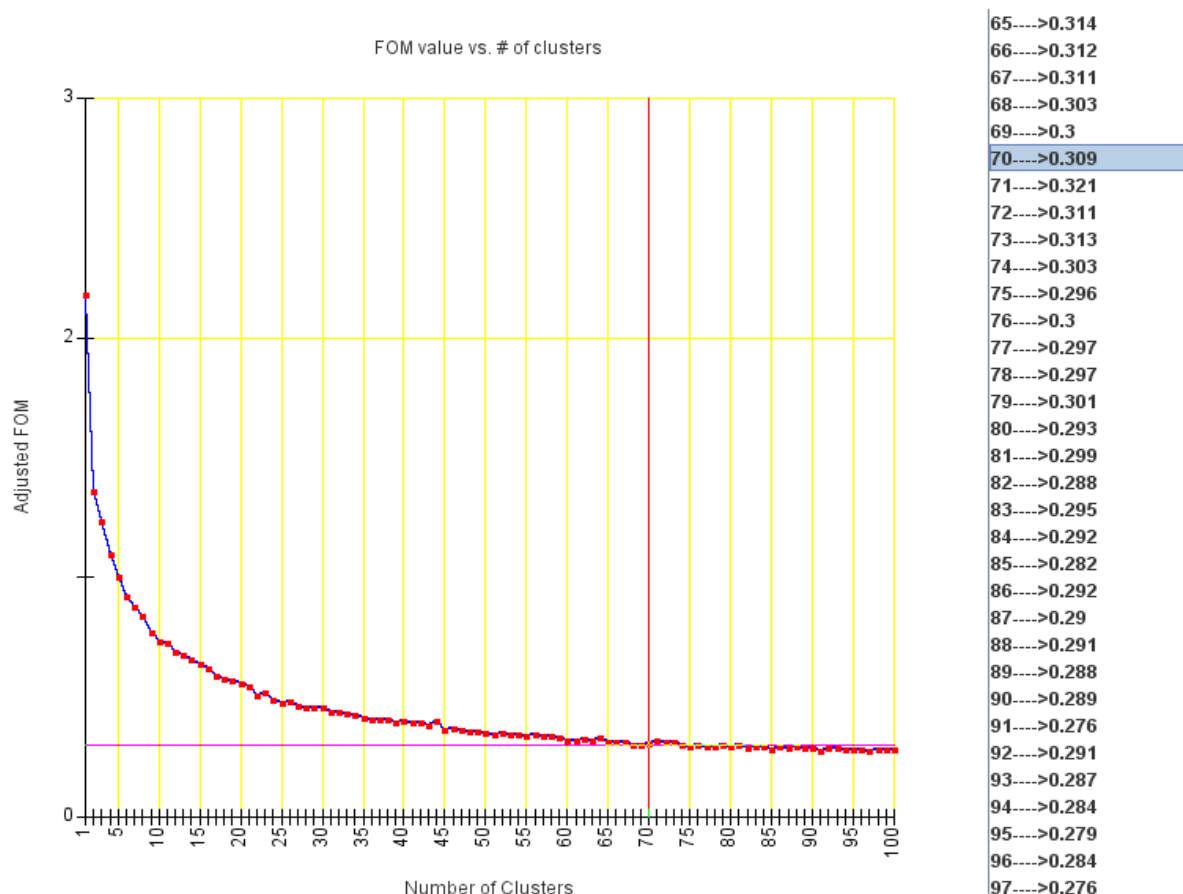
Para cada amostra de RNA de cultura exposta a Paraquat<sup>®</sup> foram feitas duas marcações com inversão dos fluoróforos, com posterior hibridação nos “chips”, conforme descrito nos itens 3.6 e 3.7 do Método. Estes resultados foram analisados, e os genes com variação na expressão estatisticamente significativa foram separados dos com variação estatisticamente não significativa.

O perfil de expressão dos genes com modulação estatisticamente significativa é mostrado na figura 21 onde cada linha representa a variação média na expressão de um gene. Como já mostrado anteriormente, na figura 09, os genes com expressão diminuída em relação ao controle aparecerão representados em verde, enquanto os com expressão aumentada aparecerão em vermelho, aumentando de intensidade proporcionalmente a variação de expressão do gene. A análise mostrou que 2070 genes responderam de forma estatisticamente significativa ao agente oxidante, mostrando um perfil homogêneo de distribuição dos genes entre superexpressos e subregulados (Figura 21).



**Figura 21:** Representação de 2070 genes, com variação na expressão estatisticamente significativa, identificados durante exposição a duas concentrações de Paraquat<sup>®</sup> (0,5 mM e 5 mM). No eixo y a escala mostra o logaritmo na base 2 da razão da expressão dos genes na cultura tratada e controle; no eixo x, são mostradas as diferentes concentrações de Paraquat<sup>®</sup>. Os dados inseridos são as médias estatísticas das réplicas de cada experimento após análise ANOVA ( $p=0,01$ ). Cada linha representa a variação média na expressão de um gene presente no chip.

Conforme descrito anteriormente para os experimentos com  $H_2O_2$ , a determinação do número ideal de “clusters”, que permitiria a visualização dos diferentes padrões básicos de expressão gênica em resposta a Paraquat<sup>®</sup> contidos na figura 21, foi realizada com o auxílio do algoritmo conhecido como “figura de mérito” (FOM – “**Figure Of Merit**”). Os resultados deste algoritmo foram colocados em um gráfico com a média da variação de expressão entre os genes no eixo y (valor de FOM) e o número de “clusters” no eixo x (Figura 22). De acordo com os critérios previamente estabelecidos (item 3.8), o número de grupos escolhido foi 70. A intersecção entre o valor de FOM e 70 grupos é mostrada por duas linhas em rosa na figura 22.



**Figura 22:** Gráfico gerado pelo algoritmo FOM para os genes estatisticamente significativos expressos durante a exposição à Paraquat<sup>®</sup>. O valor no plotado no eixo y é a média entre as variações de expressão dos genes localizados em cada “cluster”. No eixo x, temos o número de “clusters” de 1 a 100 (número máximo informado pelo operador). Na coluna, à direita, é apresentada uma lista com os números de “clusters” em ordem crescente, e o valor médio obtido da variação de expressão entre os genes de cada um. Em destaque, na coluna, o número de “clusters” selecionado pelo operador e o seu valor de FOM, mostrado no gráfico pelo cruzamento das linhas em rosa.

#### 4.2.3 AGRUPAMENTO DOS GENES PELO PERFIL DE EXPRESSÃO

Os dados dos genes com variação estatisticamente significativa na expressão foram agrupados de acordo com o seu perfil de resposta às diferentes concentrações do agente oxidante utilizando um algoritmo de “K-means”, para gerar os “clusters” ou grupos com padrões de resposta semelhantes entre seus integrantes. Os 70 grupos de genes modulados em resposta à Paraquat<sup>®</sup> são mostrados na figura 23. No eixo x, são mostradas as diferentes concentrações de Paraquat<sup>®</sup> (0, 0,5 e 5 mM). Na parte inferior direita do gráfico aparece o número daquele grupo enquanto o número de genes que constitui cada grupo é destacado em azul na parte superior.

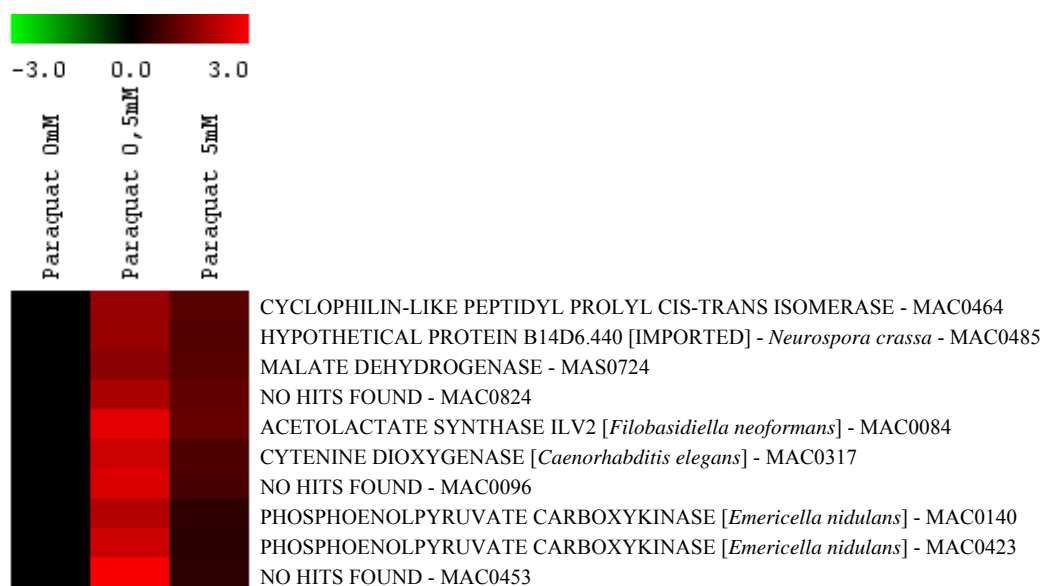




**Figura 23:** Agrupamentos de 2070 genes com variação estatisticamente significativa, totalizando 70 “clusters”. Cada “cluster” é formado por genes com variações semelhantes na expressão, em exposição a diferentes concentrações de Paraquat®. A disposição dos experimentos foi feita da seguinte forma: no eixo y a escala mostra a variação para cada “cluster” do logaritmo na base 2 da razão da expressão dos genes na cultura tratada e controle; no ponto inicial do eixo x, temos os dados de Paraquat® 0 mM, seguidos pelos de 0,5 mM e 5 mM. Destacados por quadros vermelhos, 8 “clusters” que serão analisados individualmente. A numeração na parte inferior direita indica a ordem de cada “cluster”.

Os grupos destacados por quadros vermelhos na figura 23 foram selecionados para uma análise individual (Figuras 24 a 31), da mesma forma como descrito no item 4.1.3. A coluna “0 mM Paraquat” representa a igualdade da expressão dos genes na cultura tratada e controle e, portanto o resultado do logaritmo da razão entre eles é zero (0.0) apresentado na cor preta.

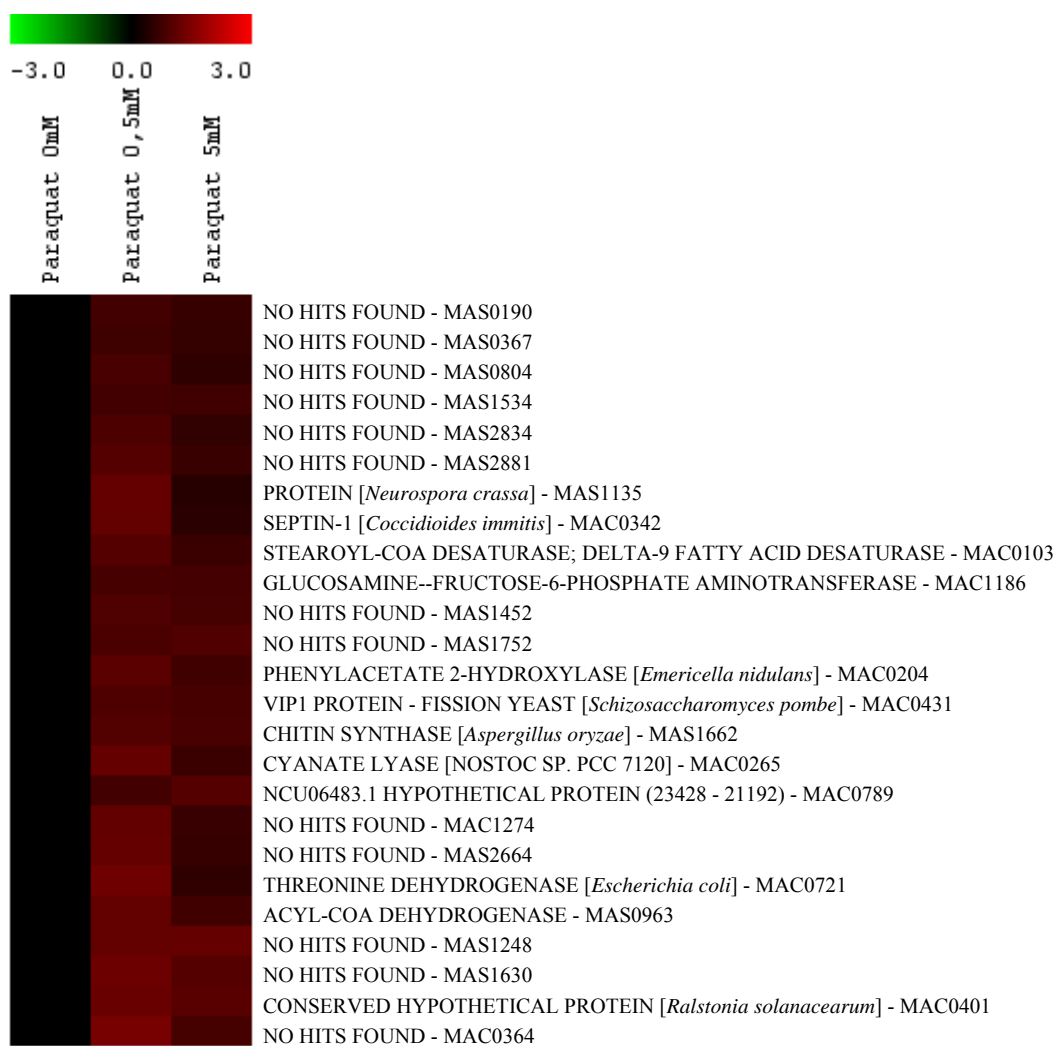
Nos grupos formados por estas figuras pode-se observar que o padrão de resposta ao Paraquat®, em alguns casos, é oposto em relação às duas concentrações utilizadas, o que mostra mecanismos de resposta diferentes ao mesmo agente, com ativação ou inativação de genes de forma dependente da quantidade de EROs imposta ao fungo. Inicialmente são mostrados os grupos 2 (Figura 24) e 62 (Figura 25) que apresentam aumento de expressão em resposta às duas concentrações de Paraquat®.



**Figura 24:** “Cluster” 2, destacado em vermelho na figura 23. É possível observar 3 genes sem função conhecida (*No hits found*) entre outros 7 com descritores. Suas expressões estão aumentadas nos tratamentos com Paraquat®.

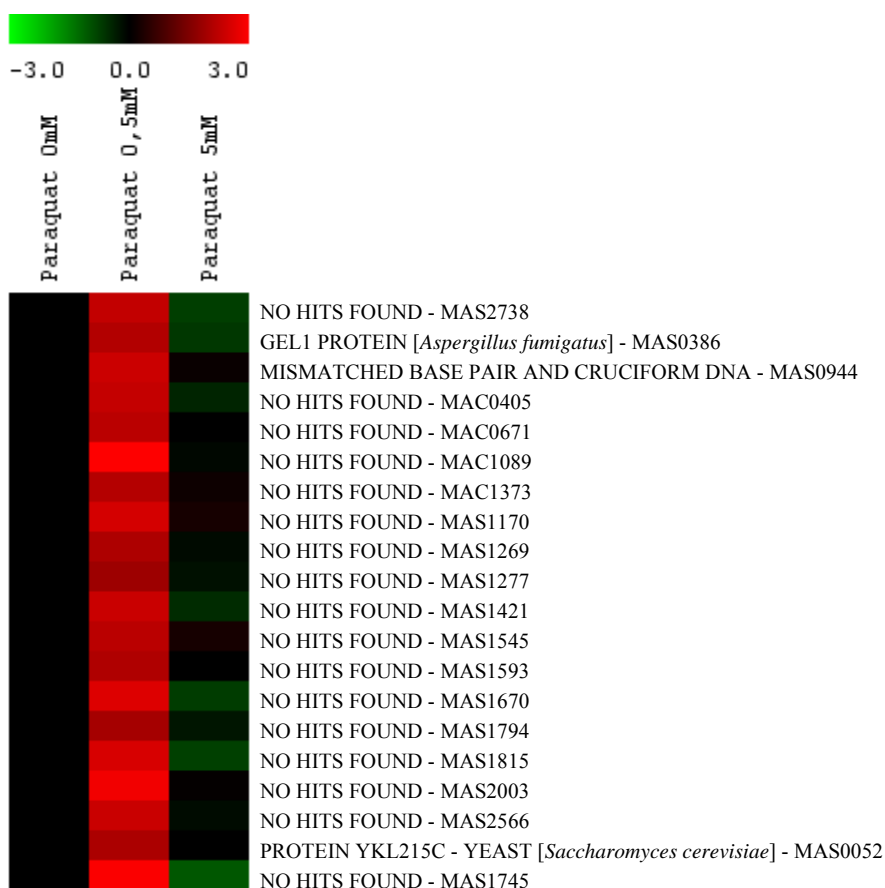
Na figura 24 (“cluster” 2) o padrão de resposta ao agente é a superexpressão; 3 genes (de um total de 10) aparecem sem função conhecida, enquanto destacam-se os genes de malato desidrogenase (MAS0724), cisteína dioxigenase (MAC0317) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (MAC0140 e MAC0423). O aumento na expressão deste grupo é maior em resposta à concentração de Paraquat® de 0,5 mM, quando comparado ao tratamento por 5 mM, mostrando que estes genes fazem parte da resposta inicial do fungo ao estresse oxidativo que, no entanto, quando taxas maiores de EROs são impostas ao *P. brasiliensis* talvez outros genes se tornem mais ativos na detoxificação.

Um gene de quitina sintase (MAS1662) pode ser visto com sua expressão aumentada à Paraquat®, na figura 25 (“cluster” 62). Além deste, aparecem neste grupo os genes das enzimas glucosamina-frutose 6-fosfato aminotransferase (MAC1186) e fenilacetato 2-hidroxilase (MAC0204). Todos com sua expressão aumentada em resposta às duas concentrações de Paraquat®.



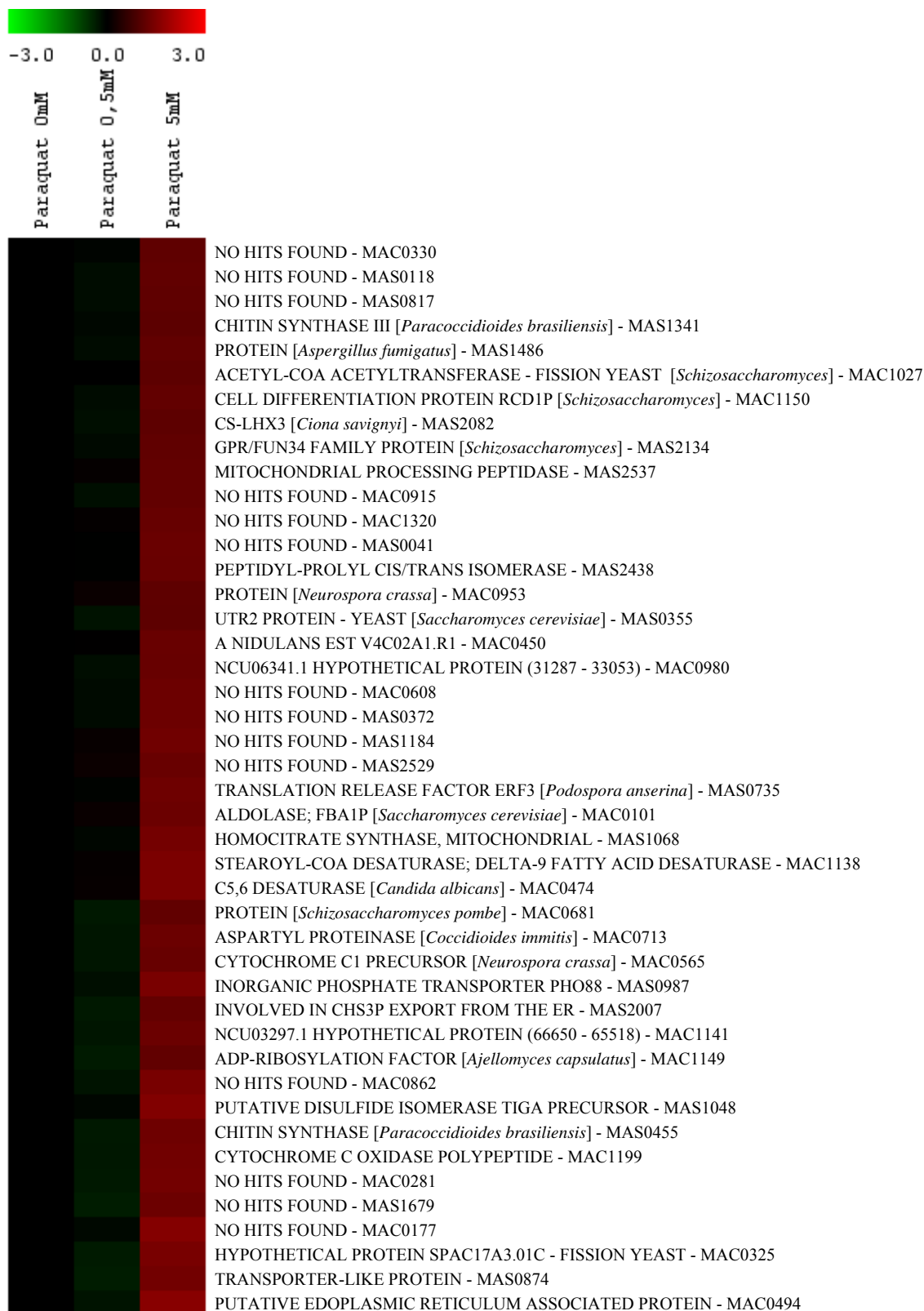
**Figura 25:** “Cluster” 62, destacado em vermelho na figura 23 que apresenta 13 genes sem função conhecida (*No hits found*) de um total de 25 que têm suas expressões aumentadas nos tratamentos com Paraquat®.

A figura 26 mostra o “cluster” 35 com um padrão de expressão que apresenta aumento em resposta a menor concentração de Paraquat®, retornando aos níveis basais ou apresentando leve superexpressão ou subregulação em resposta a 5 mM. Este grupo é composto em sua maioria por genes sem função conhecida (17 de um total de 20). Dos 3 genes com função descrita, destaca-se o de uma enzima de reparo de DNA, ativada provavelmente para trocar nucleotídeos oxidados, num processo de reparo de bases mal pareadas (mismatched base repair and cruciform DNA - MAS0944)



**Figura 26:** “Cluster” 35, destacado em vermelho na figura 23. É possível ver um gene de reparo de DNA (MAS0944) e muitos genes sem função conhecida (*No hits found*). Suas expressões estão aumentadas nos tratamentos com Paraquat® 0,5 mM e voltam ao nível normal, levemente subreguladas ou superexpressas nos tratamentos com 5 mM.

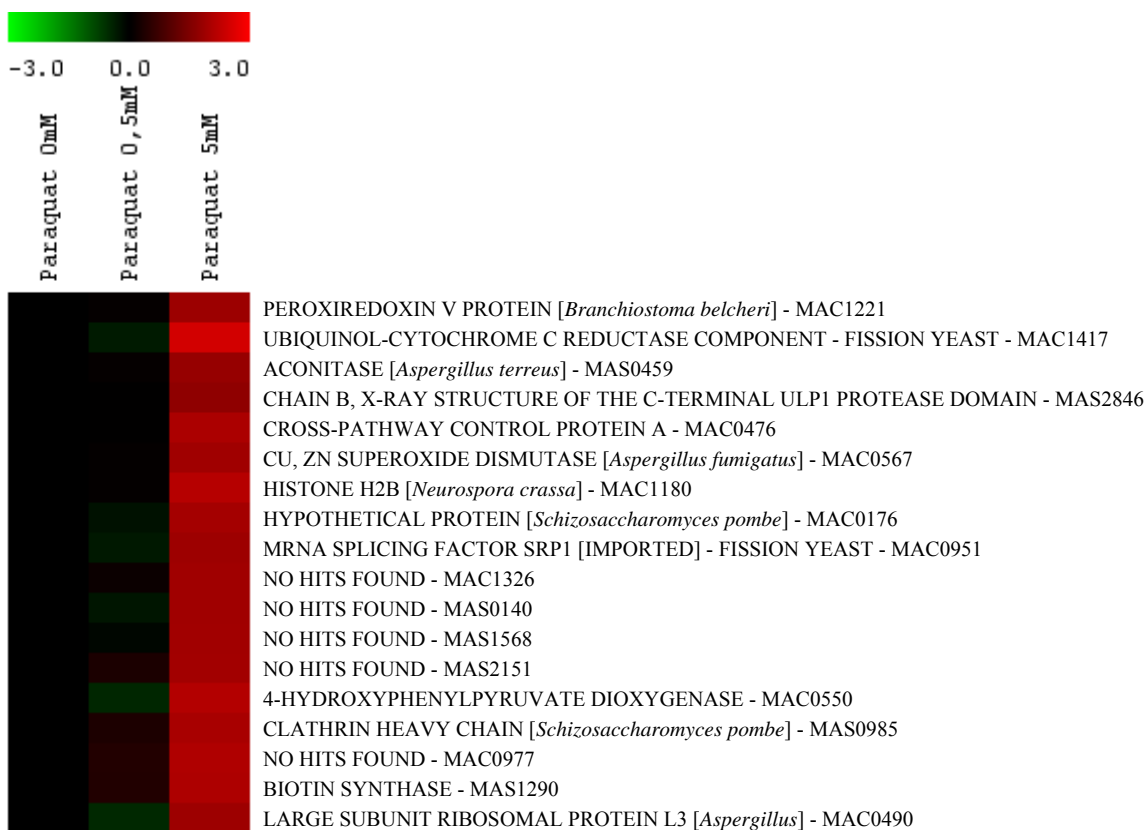
Na figura 27 (“cluster” 21) a modulação dos genes em resposta a 0,5 mM de Paraquat® é praticamente nula, enquanto em resposta a 5 mM existe um aumento significativo na expressão destes, indicando que a ativação do grupo apresentado se dá apenas em altas concentrações de radicais livres. Neste grupo é possível destacar o gene da enzima frutose 1,6 bifosfato aldolase (descrita apenas como aldolase na figura) (MAC0101), homocitrato sintase mitocondrial (MAS1068), de um precursor do citocromo C1 (MAC0565), um transportador de fosfato inorgânico (MAS0987) e citocromo C oxidase (MAC1199). Nesta figura aparecem outros dois genes de quitina sintase de *Paracoccidioides brasiliensis* (MAS 1341 – quitina sintase III e MAS0455), com padrão semelhante ao mostrado no “cluster” 62 (Figura 25).



**Figura 27:** “Cluster” 21, destacado em vermelho na figura 23, que apresenta 15 genes sem função conhecida (*No hits found*) de um total de 44. Suas expressões estão aumentadas nos tratamentos com Paraquat® 5 mM.

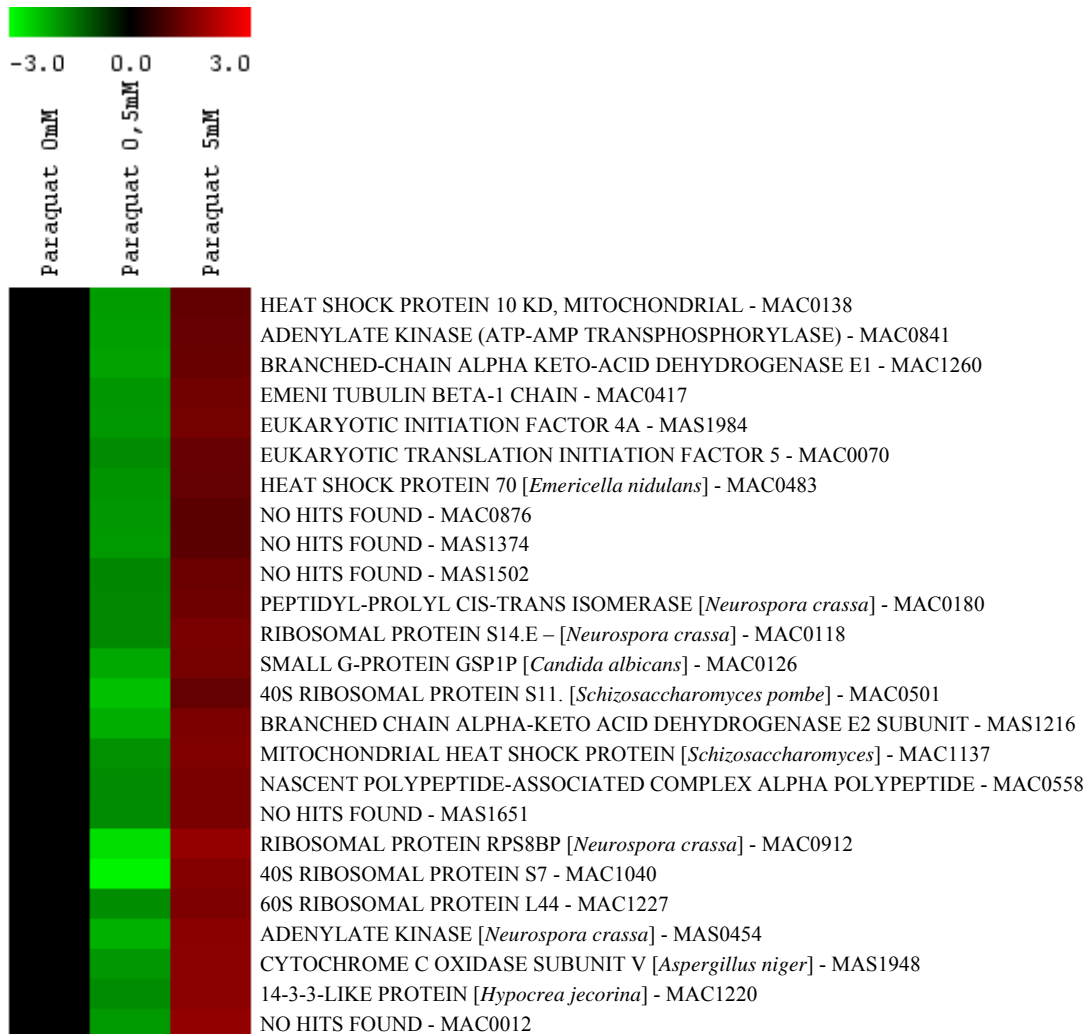
Na figura 28 (“cluster” 43) observa-se um padrão semelhante ao anterior com fraca modulação em resposta a 0,5 mM de Paraquat® e aumento significativo da expressão a 5 mM. Genes importantes podem ser vistos neste grupo, como da superóxido dismutase de cobre e

zinco (MAC0567), peroxirredoxina V (MAC1221), um componente da ubiquinol citocromo C redutase (MAC1417), aconitase (MAS0459), novamente os genes de 4HPPD (MAC0550) e biotina sintase (MAS1290).



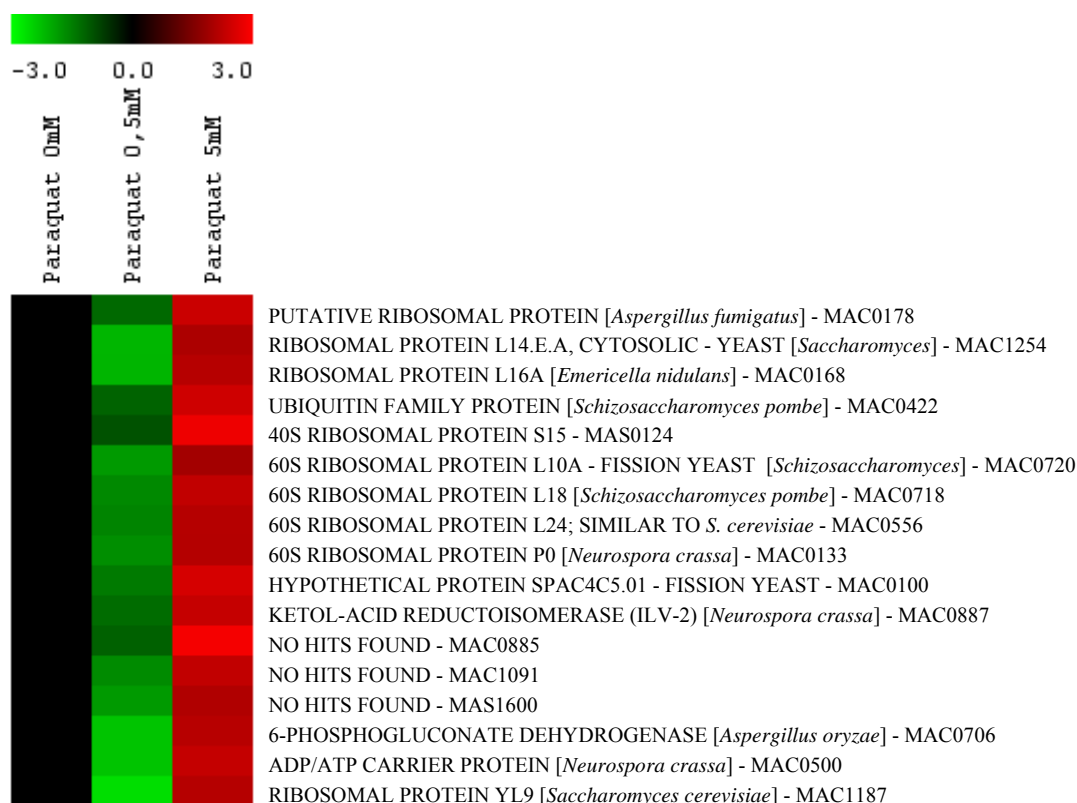
**Figura 28:** “Cluster” 43, destacado em vermelho na figura 23. É possível visualizar 5 genes sem função conhecida (*No hits found*) entre os 18 que formam o grupo. Suas expressões estão aumentadas nos tratamentos com Paraquat® 5 mM.

No “cluster”13 (Figura 29) a resposta ao agente oxidante é oposta em relação às duas concentrações utilizadas (subregulação em resposta a 0,5 mM e superexpressão em resposta a 5 mM de Paraquat®). Além de alguns genes de proteínas ribossomais, podem ser vistos dois genes de proteínas mitocondriais de “heat shock” (MAC0138 e MAC1173), um da proteína de “heat shock” de 70 kDa (MAC0483) e o gene da subunidade V da enzima citocromo C oxidase (MAS1948).



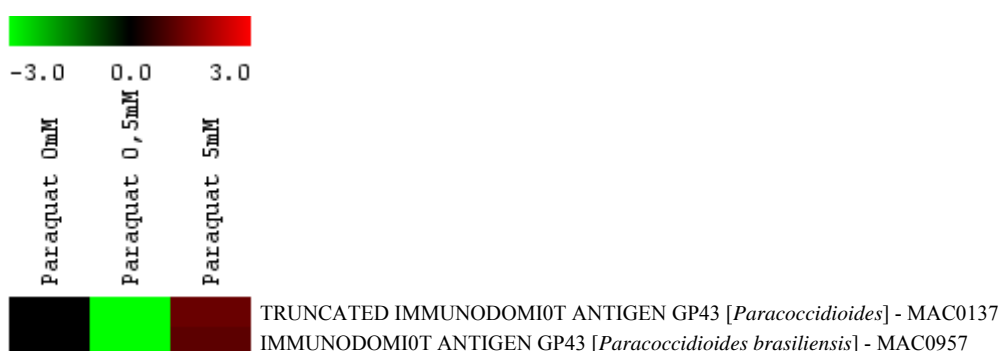
**Figura 29:** “Cluster” 13, destacado em vermelho na figura 23, que apresenta 5 genes sem função conhecida (*No hits found*) e vários genes de proteínas ribossomais. Suas expressões estão diminuídas nos testes com Paraquat® 0,5 mM e aumentadas nos tratamentos com 5 mM.

Na figura 30 (“cluster” 42) aparece novamente um padrão de resposta semelhante ao visto no grupo anterior (Figura 29) (subregulação em resposta a 0,5 mM e superexpressão em resposta a 5 mM de Paraquat®). Neste grupo também aparecem vários genes de proteínas ribossomais (8 genes), mostrando coerência na resposta de um grande grupo destas proteínas. Além destes é possível destacar o gene da enzima 6-fosfogluconato desidrogenase (MAC0706).



**Figura 30:** “Cluster” 42, destacado em vermelho na figura 23 que apresenta um padrão de expressão semelhante ao da figura 29, com diminuição na resposta a 0,5 mM e aumento a 5 mM de Paraquat®. É possível observar 3 genes sem função conhecida (*No hits found*), e vários genes de proteínas ribossomais.

No “cluster” 60 (Figura 31) podem ser vistos 2 genes da glicoproteína gp43, maior componente antigênico do *P. brasiliensis*. Suas expressões estão extremamente diminuídas em resposta à concentração de 0,5 mM de Paraquat®.



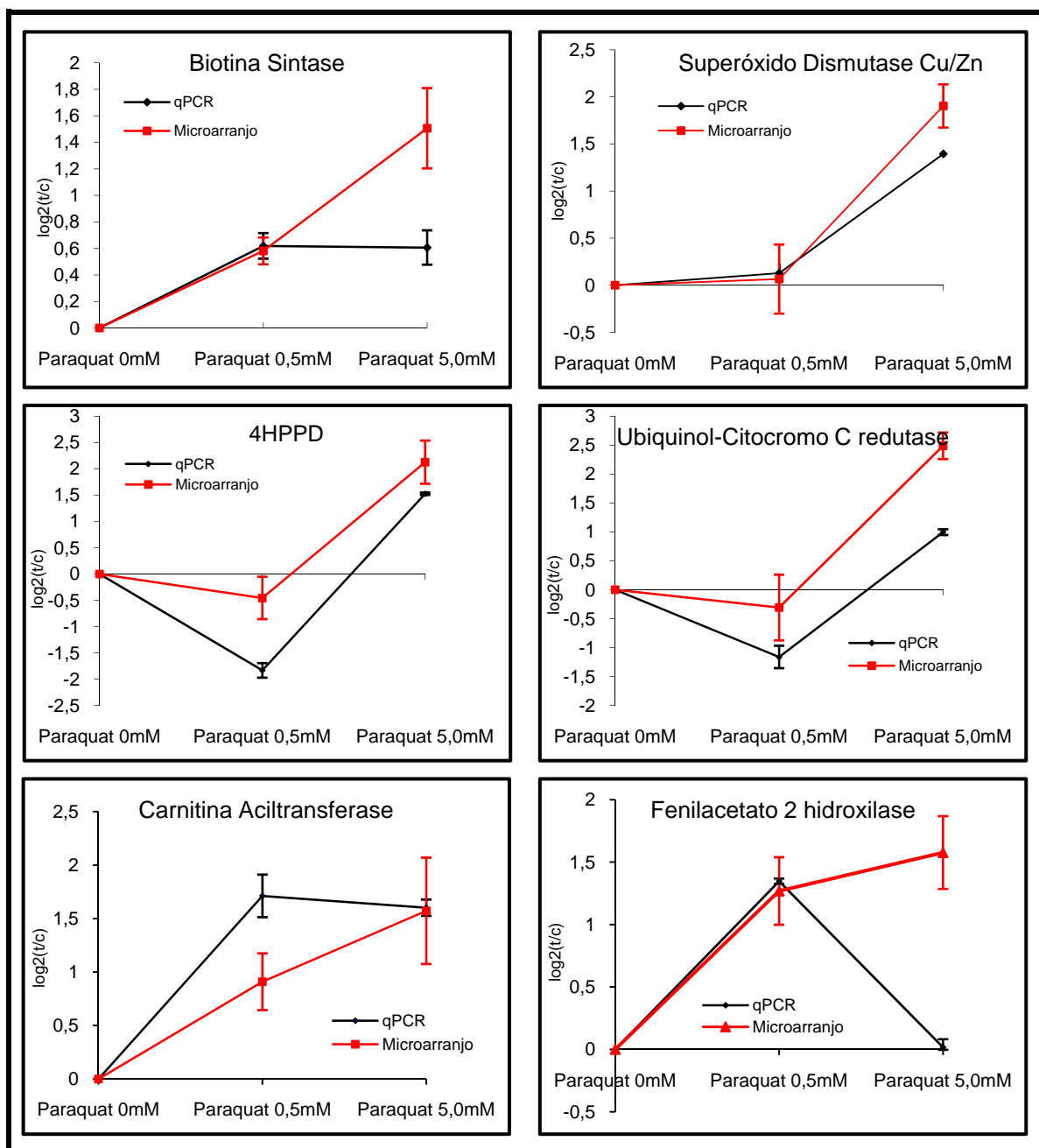
**Figura 31:** “Cluster” 60, destacado em vermelho na figura 23. É possível observar dois genes da glicoproteína gp43 com expressões bastante diminuídas no tratamento com Paraquat® 0,5 mM e aumentadas a 5 mM.

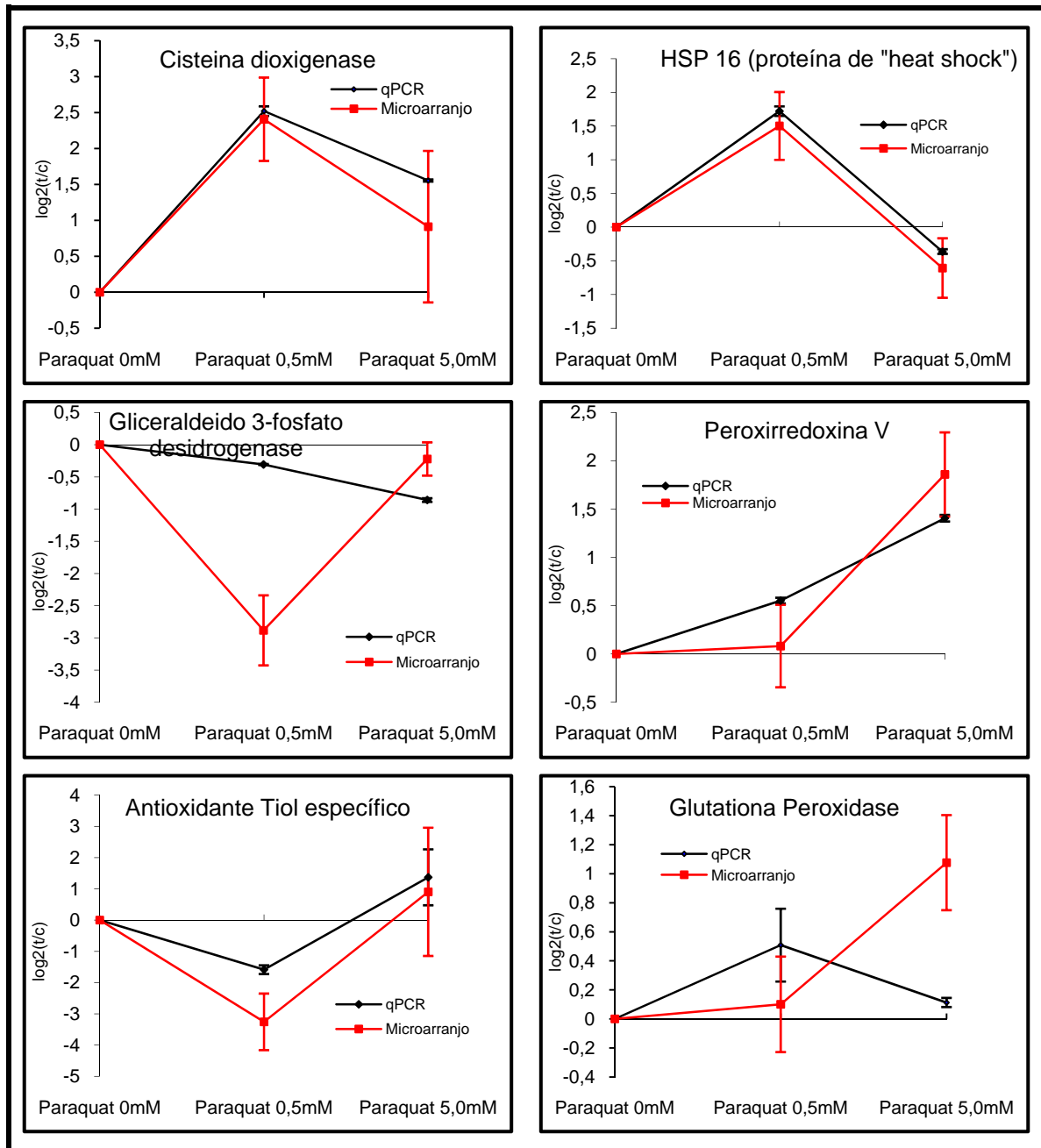
#### 4.2.4 CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS DE HIBRIDAÇÃO POR qPCR

Foram selecionados 12 genes com modulação estatisticamente significativa na expressão e que pudessem ter sua atividade relacionada ao estresse oxidativo para validação dos resultados de hibridação em microarranjos de DNA pela técnica de qPCR (as seqüências



dos “primers” utilizados para amplificação de cada gene podem ser vistas no Anexo I). Os dados obtidos foram plotados em gráficos que podem ser vistos no quadro abaixo (Figura 32). No eixo X estão colocadas as diferentes concentrações de Paraquat<sup>®</sup> utilizadas nos experimentos e no eixo Y o logaritmo na base 2 da razão entre a expressão do gene na cultura tratada (t) e sua expressão na cultura controle (c). As linhas pretas referem-se aos dados de qPCR, enquanto as vermelhas aos dados de hibridação em microarranjos de DNA. As barras de erro representam o desvio padrão de cada experimento calculado para três réplicas de qPCR e quatro de hibridação em microarranjos de DNA.

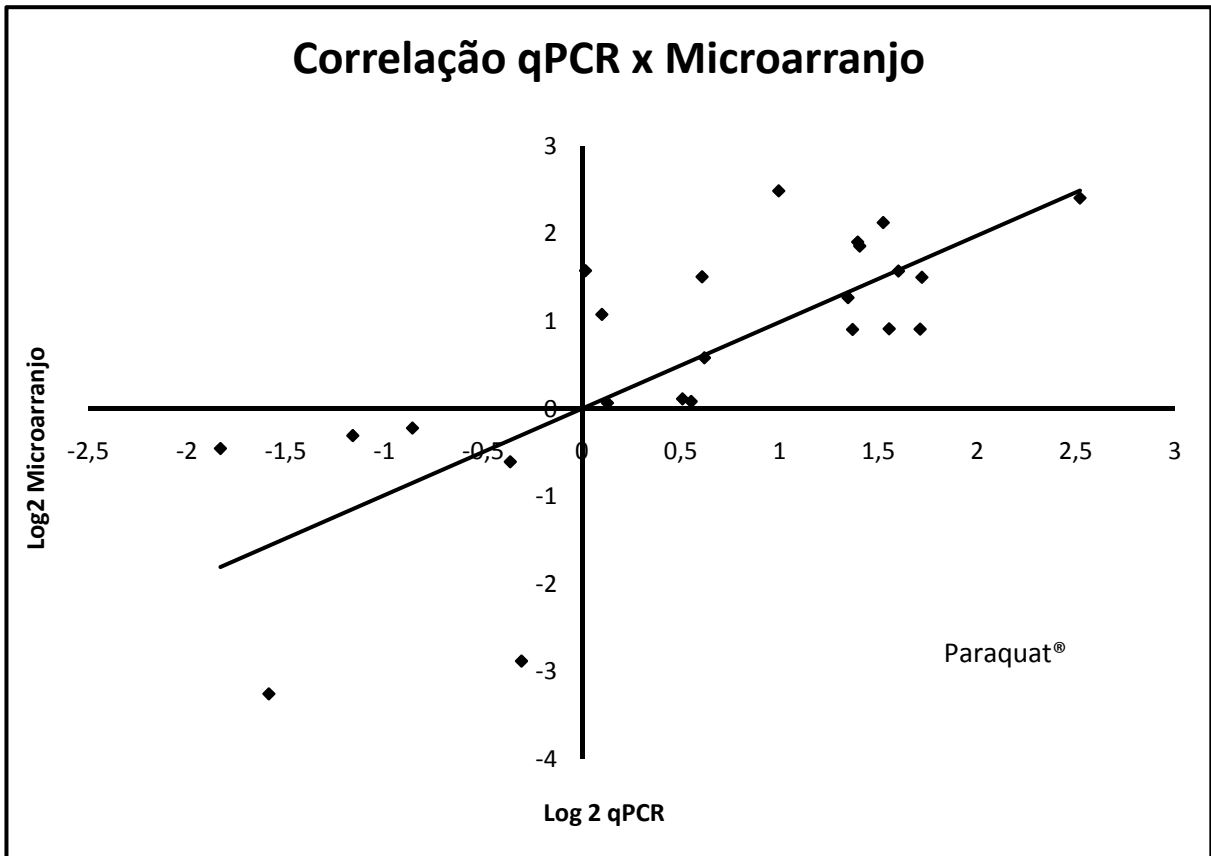




**Figura 32:** Comparação dos dados obtidos nas hibridações em microarranjos de DNA por qPCR. São mostrados 12 genes (biotina sintase – MAS1290, superóxido dismutase de Cu/Zn – MAC0567, 4HPPD – MAC0550, ubiquinol citocromo C redutase – MAC1417, carnitina aciltransferase – MAC0495, fenilacetato 2 hidroxilase – MAC1183, cisteína dioxigenase – MAC0317, proteína de “heat shock” HSP 16 – MAC0098, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase – MAC0263, peroxirredoxina V – MAC1221, antioxidante tiol específico – MA1226 e glutaciona peroxidase – MAC0436) com modulação estatisticamente significativa na expressão. No eixo X estão colocadas as diferentes concentrações de Paraquat<sup>®</sup> utilizadas nos experimentos e no eixo Y, o logaritmo na base 2 da razão entre a expressão do gene na cultura tratada (t) e sua expressão na cultura controle (c). As linhas pretas referem-se aos dados de qPCR, enquanto as vermelhas aos dados de hibridação em microarranjos de DNA. As barras de erro representam o desvio padrão de cada experimento calculado para três réplicas de qPCR e quatro de hibridação em microarranjos de DNA.

Os dados obtidos nestes experimentos também foram colocados em um gráfico para estabelecer correlação (Figura 33) entre as técnicas. No eixo X foram colocados os dados de logaritmo na base 2 da razão entre a expressão do gene na cultura tratada com Paraquat<sup>®</sup> e sua

expressão na cultura controle obtida nos experimentos de qPCR. Enquanto no eixo Y foram colocados dados de logaritmo na base 2 da razão entre a expressão do gene na cultura tratada com Paraquat® e sua expressão na cultura controle obtida nos experimentos de hibridação em microarranjos de DNA. A linha de tendência é traçada de acordo com os valores plotados como uma reta média entre os dados.

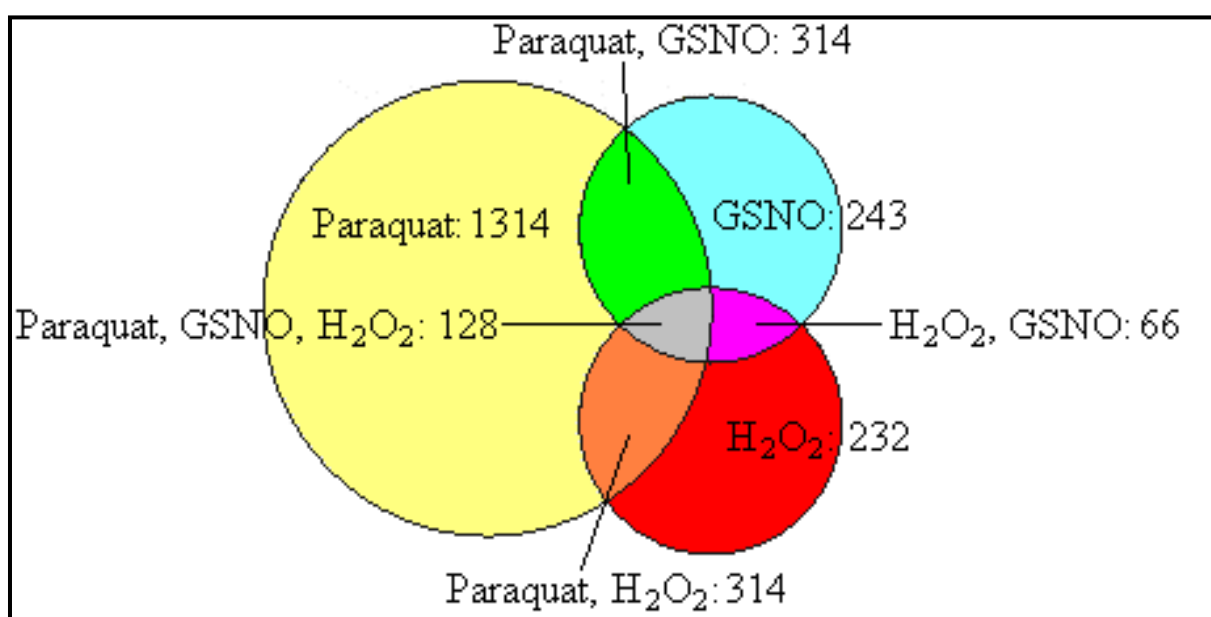


**Figura 33:** Correlação entre os dados obtidos nas hibridações em microarranjos de DNA e qPCR. No eixo X foram colocados os dados de logaritmo na base 2 da razão entre a expressão do gene na cultura tratada com Paraquat® e sua expressão na cultura controle obtida nos experimentos de qPCR. No eixo Y foram colocados dados de logaritmo na base 2 da razão entre a expressão do gene na cultura tratada com Paraquat® e sua expressão na cultura controle obtida nos experimentos de hibridação em microarranjos de DNA. A linha de tendência é traçada de acordo com os valores plotados como uma reta média entre os dados.

O coeficiente de Correlação de Pearson calculado para os dados foi de 0,7501, mostrando um alto índice de coerência, no entanto se o gráfico for observado qualitativamente (relacionando apenas o aumento ou diminuição da expressão dos genes nas duas técnicas), vê-se que 100 % dos dados são coincidentes.

### 4.3 RELAÇÕES ENTRE OS CONJUNTOS DE GENES MODULADOS EM RESPOSTA A CADA TRATAMENTO GERADOR DE RADICAIS LIVRES

Para visualizar as relações entre os conjuntos de genes modulados em resposta aos diferentes agentes oxidantes montou-se um diagrama de Venn. Neste diagrama consideramos nossos resultados obtidos para tratamentos com peróxido de hidrogênio, Paraquat®, assim como aqueles obtidos por Pimentel (2007) em resposta a GSNO, um gerador de óxido nítrico, conforme descrito no item 3.10 (Métodos) (Figura 34).



**Figura 34:** Diagrama de Venn mostrando o número de genes com modulação estatisticamente significativa em resposta exclusivamente a peróxido de hidrogênio, Paraquat® e GSNO. São mostrados os genes modulados em resposta apenas a peróxido de hidrogênio e Paraquat®, peróxido de hidrogênio e GSNO, Paraquat® e GSNO e genes modulados em resposta aos três agentes.

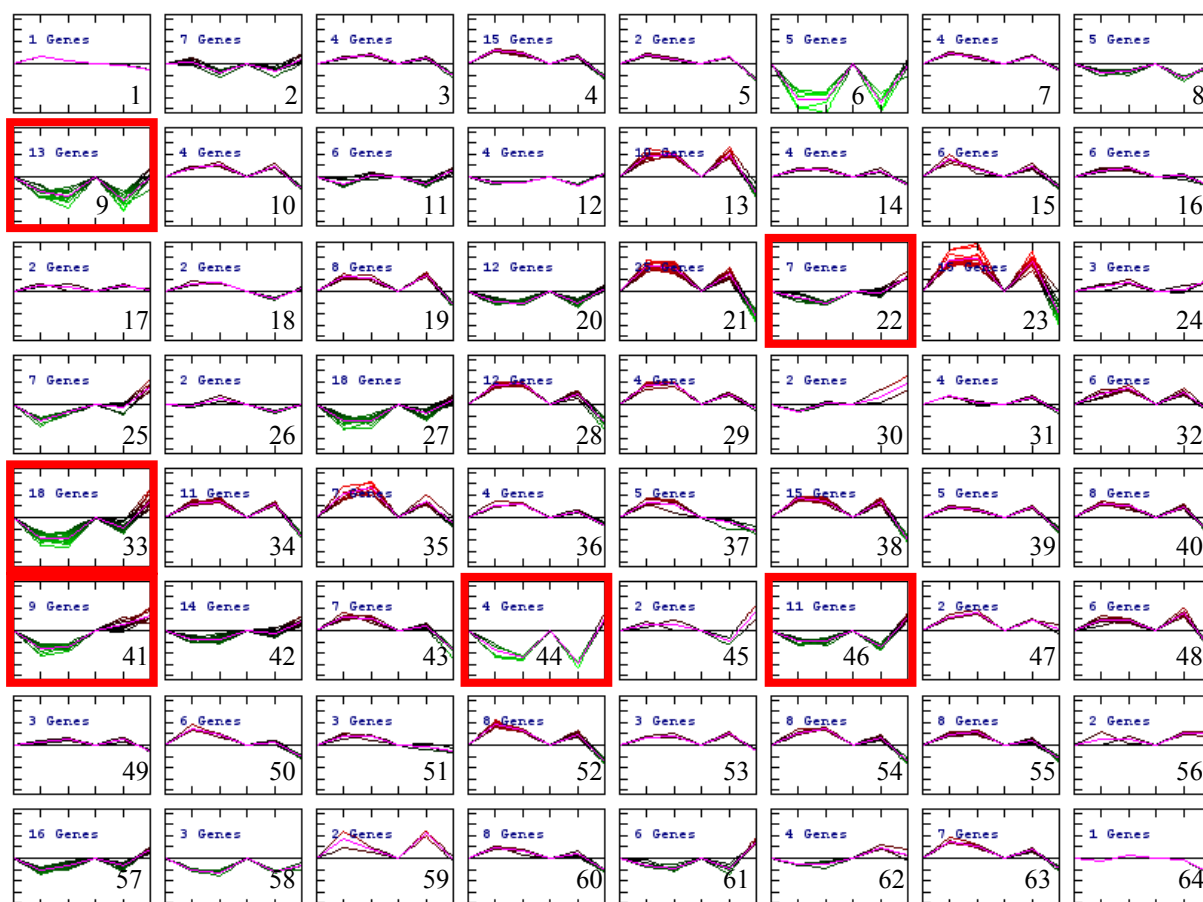
Após a inclusão no programa dos descritores dos 740 genes que são modulados de forma estatisticamente significativa em resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2070 em resposta a Paraquat® e 751 em resposta a GSNO, um diagrama é montado mostrando nas intersecções a quantidade de genes que pertencem ao mesmo tempo aos dois ou três conjuntos de dados inseridos (Figura 34). Assim é possível visualizar que 442 genes estão na lista dos que respondem tanto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quanto a Paraquat®, no entanto 314 são exclusivos aos dois agentes. Da mesma forma observa-se que 194 genes respondem tanto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quanto a GSNO, no entanto apenas 66 são exclusivos aos dois agentes e por fim dos 442 genes que respondem tanto a Paraquat® quanto a GSNO, 314 são exclusivos a estes. Existem 128 genes que respondem aos três agentes

utilizados nos experimentos, 232 genes que respondem exclusivamente a  $H_2O_2$ , 1314 exclusivamente a Paraquat® e 243 exclusivamente a GSNO.

A partir das listas de genes em comum aos agentes geradores de radicais livres obtidas no programa VennMaster versão 0.37.3, foram feitas novas figuras de mérito e agrupamentos, da mesma forma como realizado para os experimentos individualmente.

### 4.3.1 AGRUPAMENTO DE GENES MODULADOS EM RESPOSTA A $H_2O_2$ E PARAQUAT®

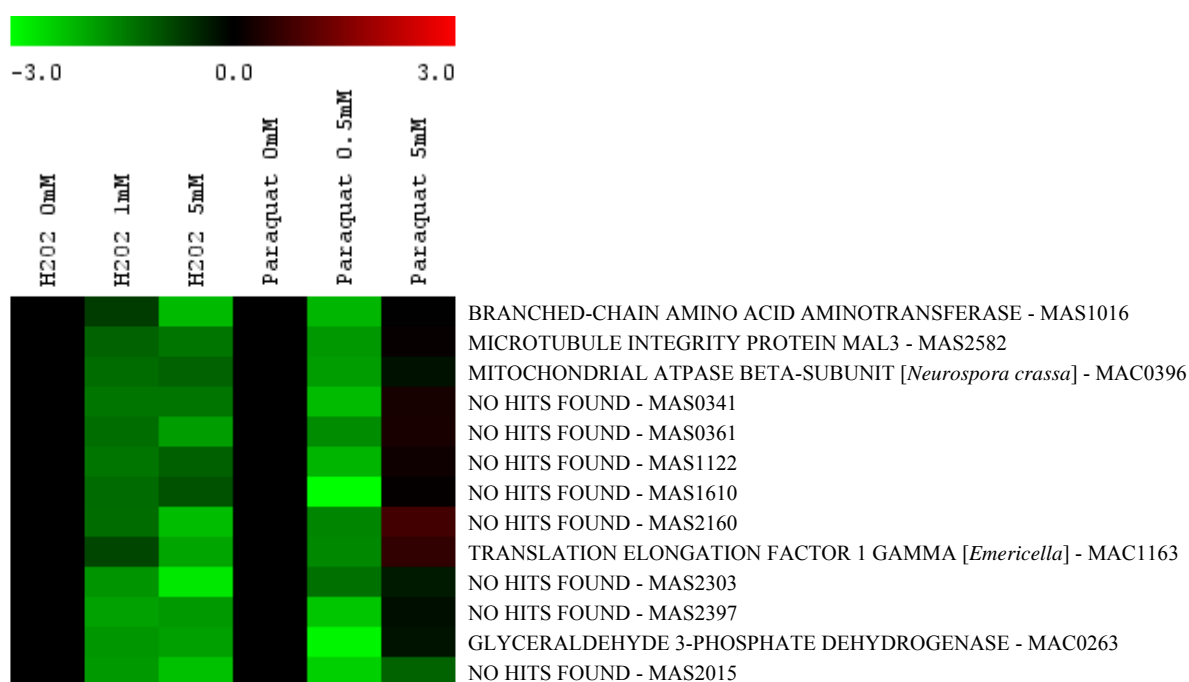
Para agrupar os 442 genes modulados a peróxido de hidrogênio e Paraquat® utilizou-se o algoritmo “K-means” montando 64 grupos, com mostra a figura 35. No eixo x, são mostradas as diferentes concentrações de  $H_2O_2$  (0 mM, 1 mM e 5 mM) e Paraquat® (0 mM, 0,5 mM e 5 mM). Os “clusters” identificados por quadros vermelhos na figura 35 podem ser vistos individualmente nas figuras 36 a 41.



**Figura 35:** Agrupamentos de 442 genes com variação estatisticamente significativa, totalizando 64 “clusters”. Cada “cluster” é formado por genes com variações semelhantes na expressão, em exposição a diferentes concentrações de  $H_2O_2$  e Paraquat®. A disposição dos experimentos foi feita da seguinte forma: no eixo y a escala mostra a variação para cada “cluster” do logaritmo na base 2 da razão da expressão dos genes na cultura

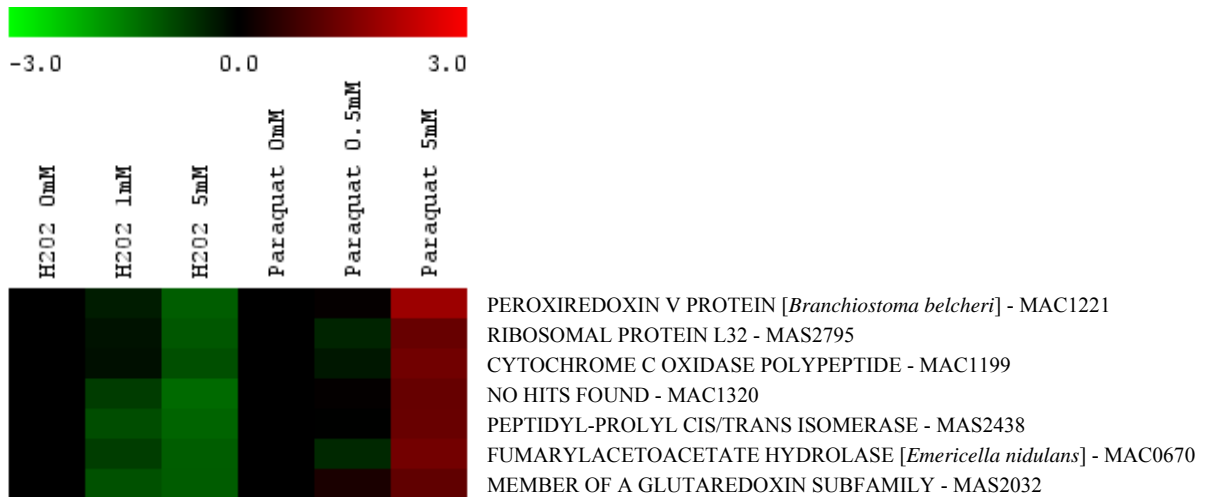
tratada e controle; no eixo x, da esquerda para direita, temos os dados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0mM, 1mM, 5mM, Paraquat® 0mM, 0,5mM e 5mM respectivamente. Destacados por quadros vermelhos, 6 “clusters” que serão analisados individualmente. A numeração na parte inferior direita indica a ordem de cada “cluster”.

Na figura 36 (“cluster” 09) observa-se 8 ESTs sem função conhecida (do total de 13). Destacam-se desta figura os genes da subunidade beta da ATPase (MAC0396) e de gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (MAC0263). A expressão dos genes deste grupo está diminuída em resposta às duas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e à menor de Paraquat®. Em relação à maior concentração de Paraquat®, alguns genes deste grupo não apresentam modulação significativa, outros mostram uma leve subregulação ou leve superexpressão.



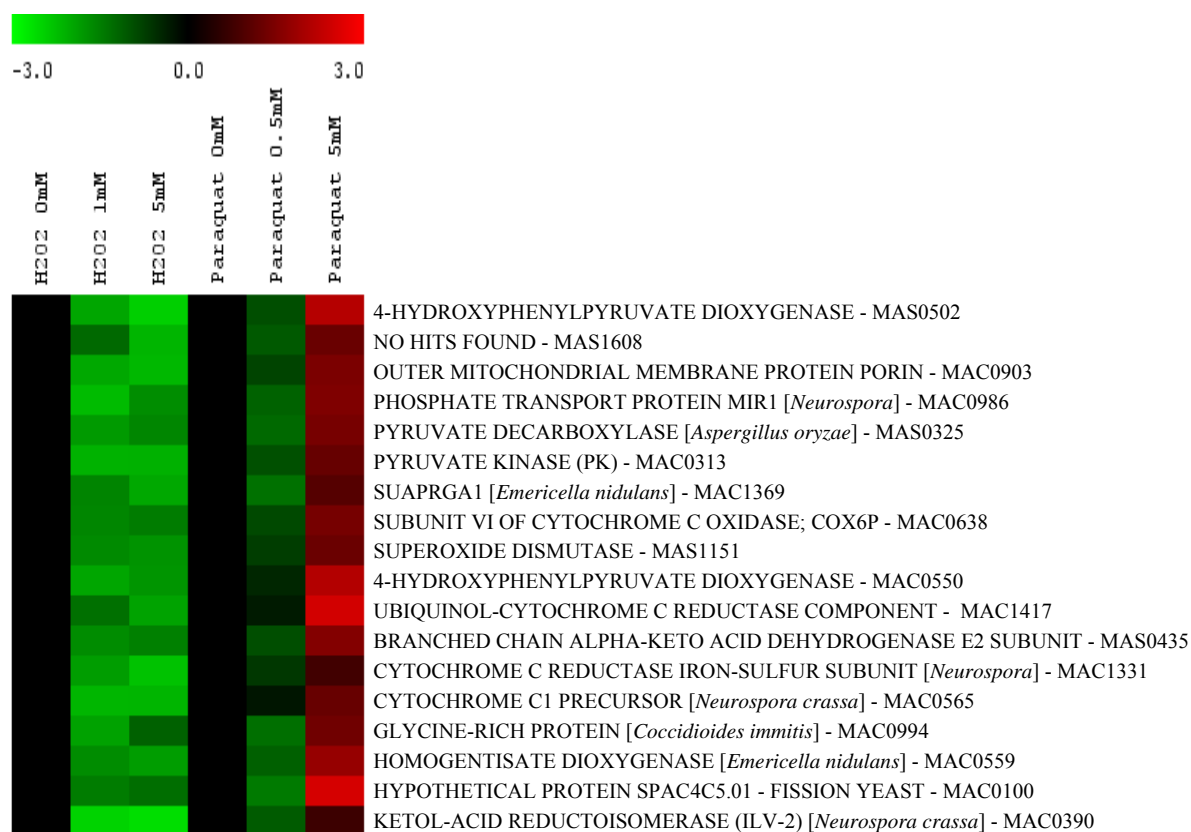
**Figura 36:** “Cluster” 09, destacado em vermelho na figura 35. É possível observar 13 genes, 8 deles sem função conhecida (*No hits found*). Suas expressões estão diminuídas nos tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Paraquat®.

No grupo 22 (Figura 37) os genes apresentados mostram subregulação em resposta à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enquanto estão superexpressos em resposta a 5 mM de Paraquat®. Quando o fungo é exposto a 0,5 mM deste último agente, a modulação dos genes apresentados nesta figura é muito pequena. Deste grupo podem ser destacados os genes de peroxirredoxina V (MAC1221), citocromo C oxidase (MAC1199), fumaril acetoacetato hidrolase (MAC0670) e um membro da subfamília da glutaredoxina (MAS2032).



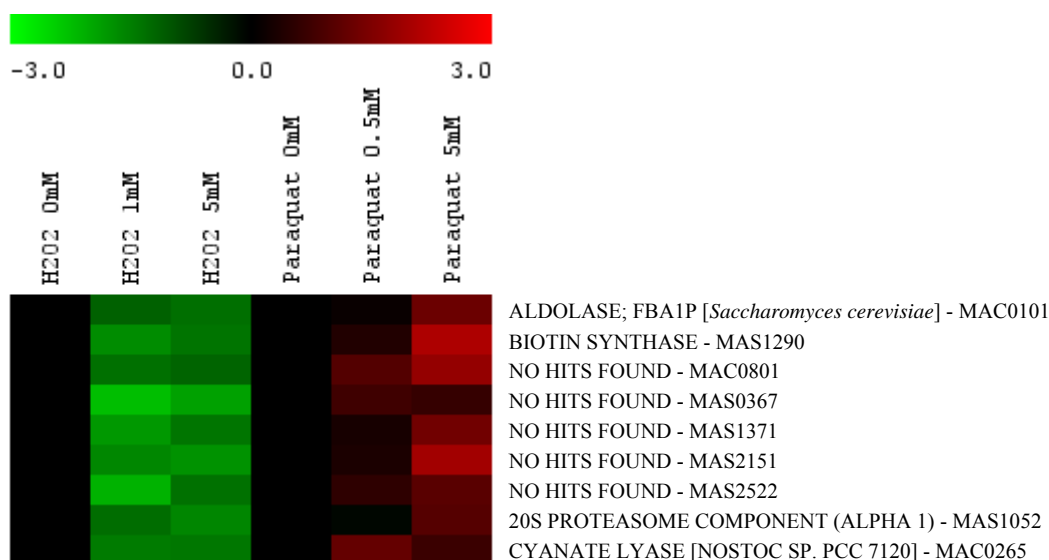
**Figura 37:** “Cluster” 22, destacado em vermelho na figura 35. É possível observar 6 genes com função já descrita e um sem função conhecida (*No hits found*). Suas expressões estão diminuídas nos tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e aumentadas em resposta à maior concentração de Paraquat<sup>®</sup>.

Na figura 38 (“cluster” 33) aparece apenas uma seqüência (de um total de 18) sem função definida. Dos outros 17 destacam-se os genes de piruvato descarboxilase (MAS0325), piruvato quinase (MAC0313), da subunidade VI de citocromo C oxidase (MAC0638), superóxido dismutase de ferro (MAS1151), dois genes de 4HPPD (MAC0550 e MAS0502), um componente da ubiquinol-citocromo C redutase (MAC1417), subunidade de ferro-enxofre da citocromo C redutase (MAC1331), um precursor de citocromo C1 (MAC0565) e homogentisato dioxigenase (MAC0559). Os genes deste grupo apresentam subregulação em resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e à menor concentração de Paraquat<sup>®</sup>, quando tratados com 5 mM deste agente, a resposta é a superexpressão.



**Figura 38:** “Cluster” 33, destacado em vermelho na figura 35. Neste grupo aparece apenas um gene sem função conhecida (*No hits found*) em um total de 18. Suas expressões estão diminuídas nas duas concentrações de  $H_2O_2$  e na menor de Paraquat® e aumentadas em resposta a 5,0 mM de Paraquat®.

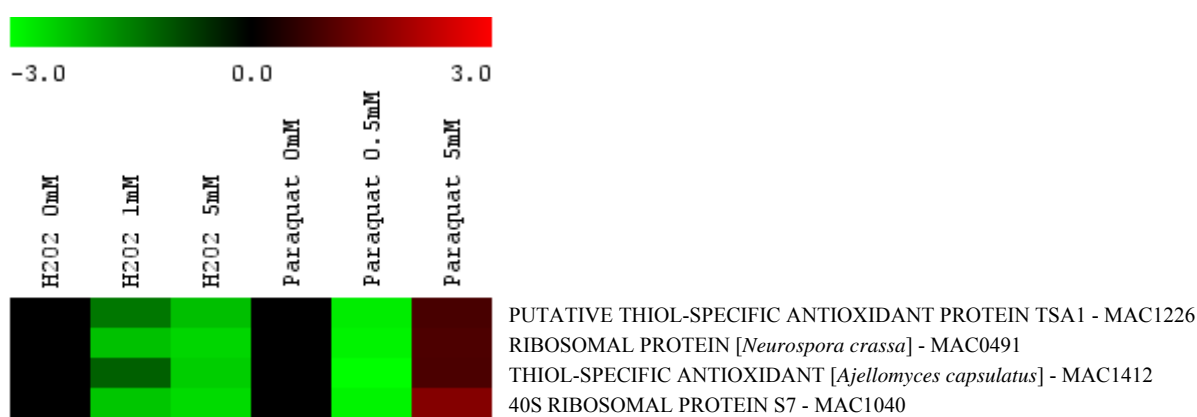
No grupo 41 (Figura 39), voltam a aparecer vários ESTs sem função conhecida (5 de um total de 9). Neste caso, o grupo apresenta diminuição na expressão em resposta a  $H_2O_2$  e aumento na resposta a Paraquat®. Destacam-se os genes de frutose 1,6 bifosfato aldolase, descrito na figura apenas como aldolase (MAC0101) e biotina sintase (MAS1290).



**Figura 39:** “Cluster” 41, destacado em vermelho na figura 35. É possível observar 9 genes, sendo 5 sem função conhecida (*No hits found*). Suas expressões estão diminuídas na resposta a  $H_2O_2$  e aumentadas em resposta a Paraquat®.

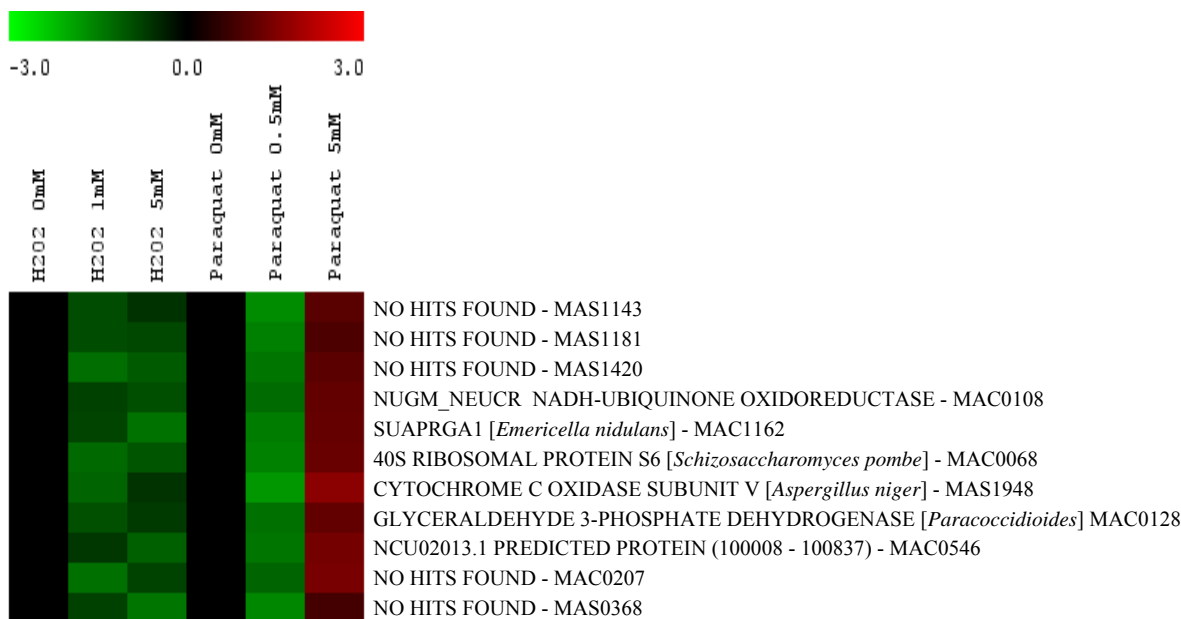


Na figura 40 (“cluster” 44) observam-se 4 genes: 2 de proteínas ribossomais (MAC0491 e MAC1040) e 2 de proteínas antioxidantes tiol-específicas (MAC1226 e MAC1412). Uma vez que estas últimas atuam diretamente na detoxificação de peróxidos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000), acreditava-se que estariam com suas expressões aumentadas em resposta a  $H_2O_2$ , no entanto, estão subreguladas a este agente e à menor concentração de Paraquat<sup>®</sup>, aumentando sua expressão apenas quando tratadas com 5 mM deste agente gerador de superóxidos.



**Figura 40:** “Cluster” 44, destacado em vermelho na figura 35. É possível observar dois genes de antioxidante tiol específico (MAC1226 e MAC1412) e dois genes de proteína ribossomal (MAC0491 e MAC1040). Suas expressões estão diminuídas nas duas concentrações de  $H_2O_2$  e na menor de Paraquat<sup>®</sup> e aumentadas em resposta a 5,0 mM de Paraquat<sup>®</sup>.

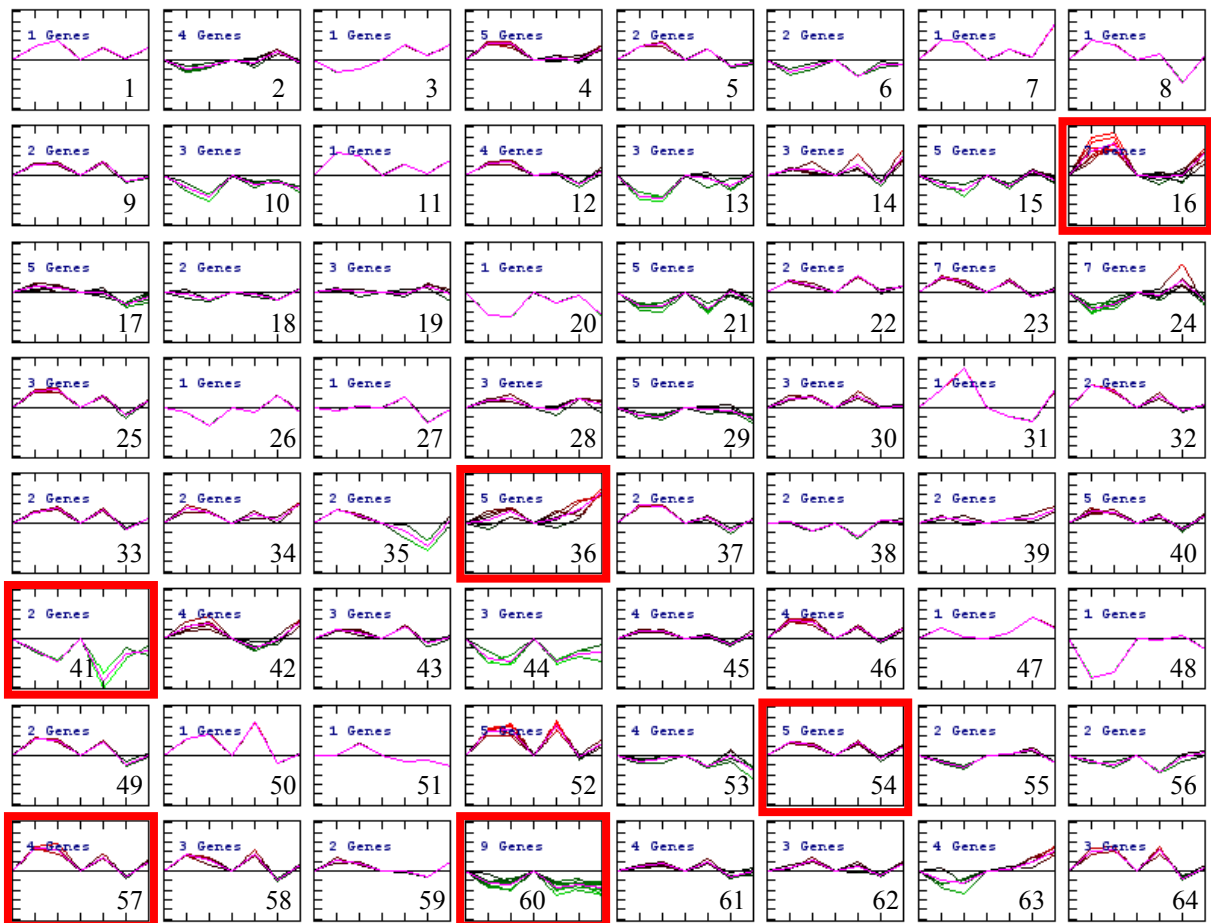
De forma semelhante ao anterior, o grupo 46 (Figura 41) apresenta subregulação em resposta a  $H_2O_2$  e Paraquat<sup>®</sup> 0,5 mM e superexpressão à maior concentração utilizada deste agente. Nesta figura podem ser vistas 5 seqüências sem funções definidas, das outras 6 podem ser destacados os genes de NADH-ubiquinona oxidoredutase (MAC0108), uma proteína ribossomal (MAC0068), da subunidade V de citocromo C oxidase (MAS1948) e da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (MAC0128).



**Figura 41:** “Cluster” 46, destacado em vermelho na figura 35. É possível observar 11 genes, sendo 5 sem função conhecida (*No hits found*). Suas expressões estão diminuídas nas duas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e na menor de Paraquat® e aumentadas em resposta a 5 mM de Paraquat®.

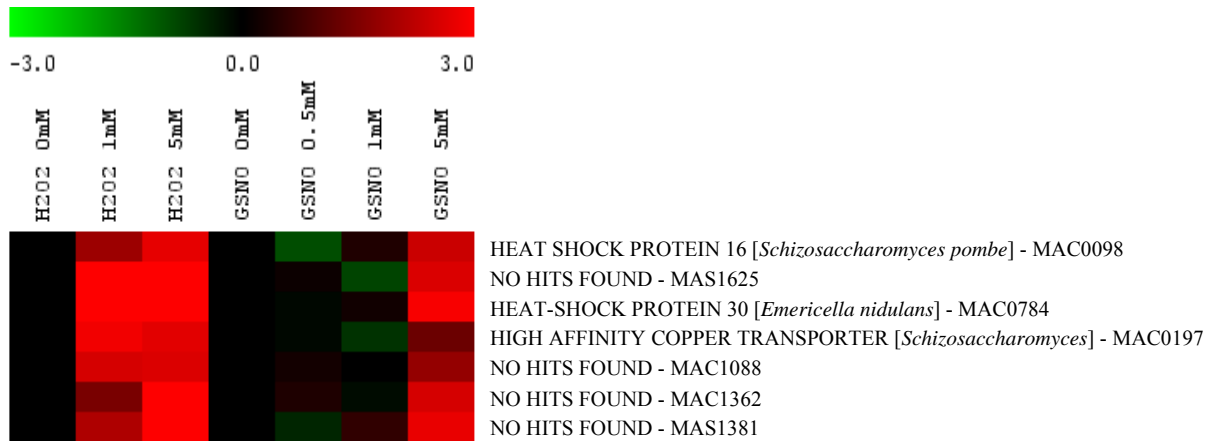
#### 4.3.2 AGRUPAMENTO DE GENES MODULADOS EM RESPOSTA A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> E GSNO

Para agrupar os 194 genes modulados em resposta à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSNO foi utilizada a divisão em 64 “clusters”, novamente com o algoritmo “k-means” (Figura 42). No eixo x, são mostradas as diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0 mM, 1 mM e 5 mM) e GSNO (0 mM, 0,5 mM, 1 mM e 5 mM). Os grupos destacados com os quadros vermelhos na figura 42 podem ser vistos individualmente nas figuras 43 a 48.



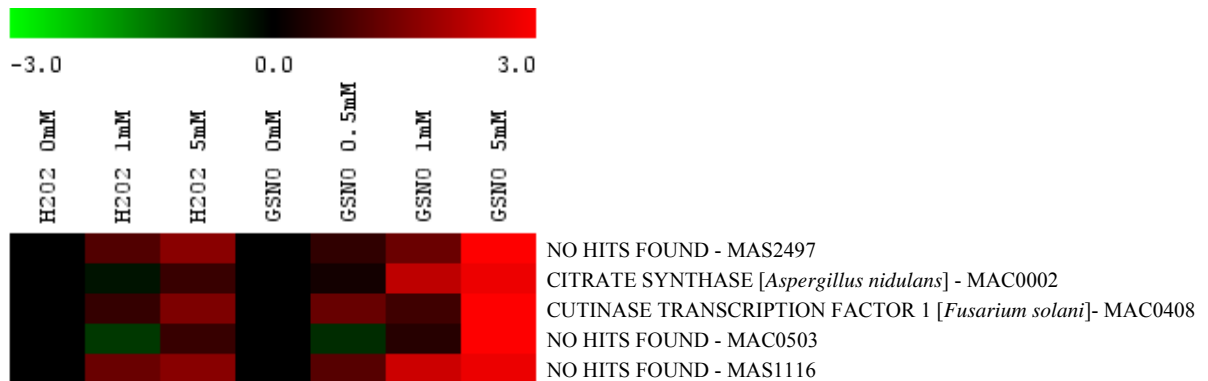
**Figura 42:** Agrupamentos de 194 genes com variação estatisticamente significativa, totalizando 64 "clusters". Cada "cluster" é formado por genes com variações semelhantes na expressão, em exposição a diferentes concentrações de  $H_2O_2$  e GSNO. A disposição dos experimentos foi feita da seguinte forma: no eixo y a escala mostra a variação para cada "cluster" do logaritmo na base 2 da razão da expressão dos genes na cultura tratada e controle; no eixo x, da esquerda para direita, temos os dados de  $H_2O_2$  0 mM, 1 mM, 5 mM, GSNO 0 mM, 0,5 mM, 1 mM e 5 mM respectivamente. Destacados por quadros vermelhos, 6 "clusters" que serão analisados individualmente. A numeração na parte inferior direita indica a ordem de cada "cluster".

Os genes de duas proteínas de "heat shock" (16 kDa – MAC0098 e 30kDa – MAC0784) e de um transportador de cobre (MAC0197) são modulados em resposta tanto a  $H_2O_2$  quanto GSNO e podem ser vistos no grupo 16 (Figura 43), onde apresentam aumento na expressão em resposta ao primeiro e a maior concentração do segundo agente utilizado. Além destes, quatro genes sem função conhecida são vistos neste "cluster".



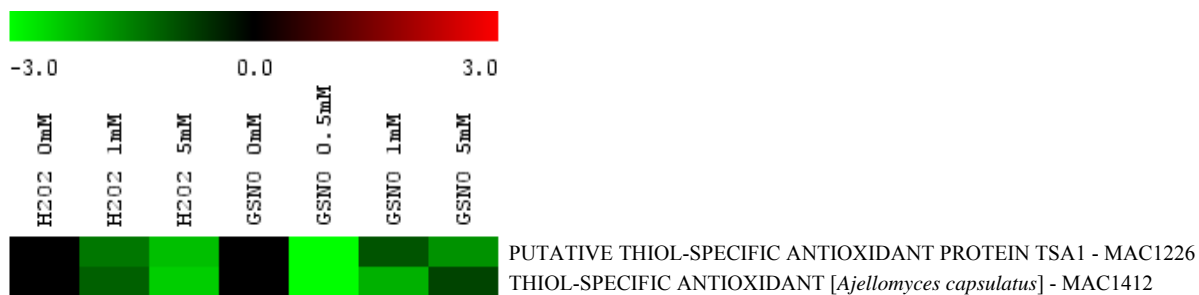
**Figura 43:** “Cluster” 16, destacado em vermelho na figura 42. Na figura são mostrados 7 genes, sendo 4 sem função conhecida (*No hits found*). Suas expressões estão aumentadas nos testes com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e em resposta à maior concentração de GSNO.

Já na figura 44 (“cluster” 36), 3 ESTs (de um total de 5) não têm sua função conhecida, enquanto os outros dois são genes de citrato sintase (MAC0002) e do fator de transcrição 1 da cutinase (MAC0408). Este grupo apresenta aumento na expressão em praticamente todas as concentrações dos dois agentes.



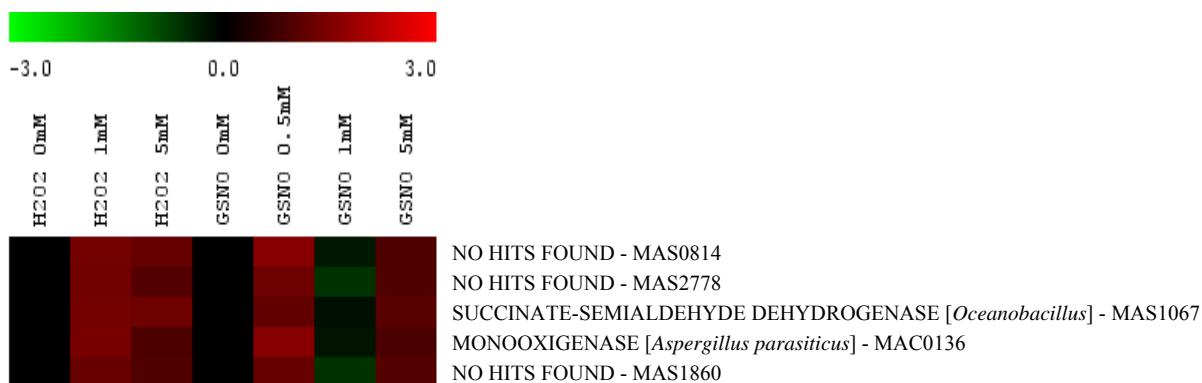
**Figura 44:** “Cluster” 36, destacado em vermelho na figura 42. Na figura são mostrados 5 genes, sendo 3 sem função conhecida (*No hits found*). Suas expressões estão aumentadas nos tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSNO.

Os dois genes de proteínas antioxidante tiol-específicas presentes no “chip” de *P. brasiliensis* podem ser vistos no grupo 41 (Figura 45), com sua expressão diminuída a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSNO.



**Figura 45:** “Cluster” 41, destacado em vermelho na figura 42. É possível observar dois genes de antioxidante tiol específico (MAC1226 e MAC1412). Suas expressões estão diminuídas nos testes com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSNO.

Na figura 46 (“cluster” 54) aparecem os genes de succinato-semialdeído desidrogenase (MAS1067) e monooxigenase (MAC0136). Além destes, 3 ESTs apresentam-se sem função conhecida e todos respondendo com superexpressão a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e à menor e maior concentração de GSNO.



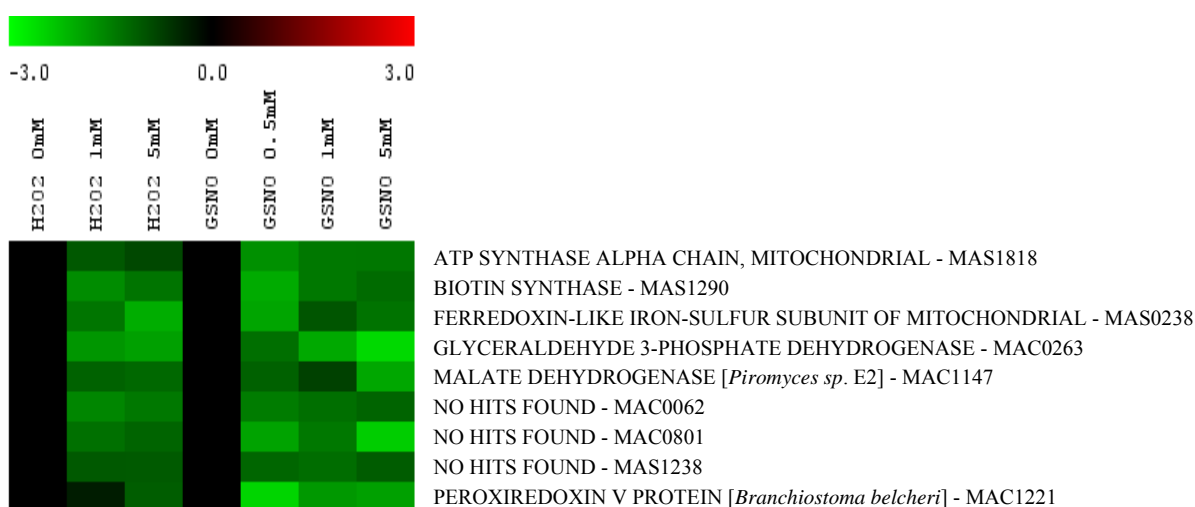
**Figura 46:** “Cluster” 54, destacado em vermelho na figura 42. É possível observar 5 genes, sendo 3 sem função conhecida (*No hits found*). Suas expressões estão aumentadas nos tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e em resposta à menor e maior concentração de GSNO.

O gene da enzima cobre amino oxidase (MAS 1168) pode ser visto novamente no “cluster” 57 (Figura 47). De forma semelhante ao grupo anterior, este apresenta superexpressão de seus genes em resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a menor e maior concentração de GSNO, em resposta a 1 mM deste último os genes mostram subregulação.



**Figura 47:** “Cluster” 57, destacado em vermelho na figura 42, que apresenta 4 genes, sendo 2 sem função conhecida (*No hits found*). Suas expressões estão aumentadas nos tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e em resposta à maior e menor concentração de GSNO.

No “cluster” 60 (Figura 48) todos os genes estão subregulados em resposta aos dois agentes utilizados. Destacam-se deste grupo, o gene da cadeia alfa da ATP sintase (MAS1818), de biotina sintase (MAS1290) da subunidade ferro-enxofre da ferredoxina mitocondrial (MAS0238), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (MAC0263), malato desidrogenase (MAC1147) e peroxirredoxina V (MAC1221). Podem ser vistos ainda 3 ESTs sem função conhecida.



**Figura 48:** “Cluster” 60 destacado em vermelho na figura 42, que apresenta 9 genes, sendo 3 sem função conhecida (*No hits found*). Suas expressões estão diminuídas nos tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSNO.

### 4.3.3 AGRUPAMENTO DE GENES MODULADOS EM RESPOSTA A PARAQUAT<sup>®</sup> E GSNO

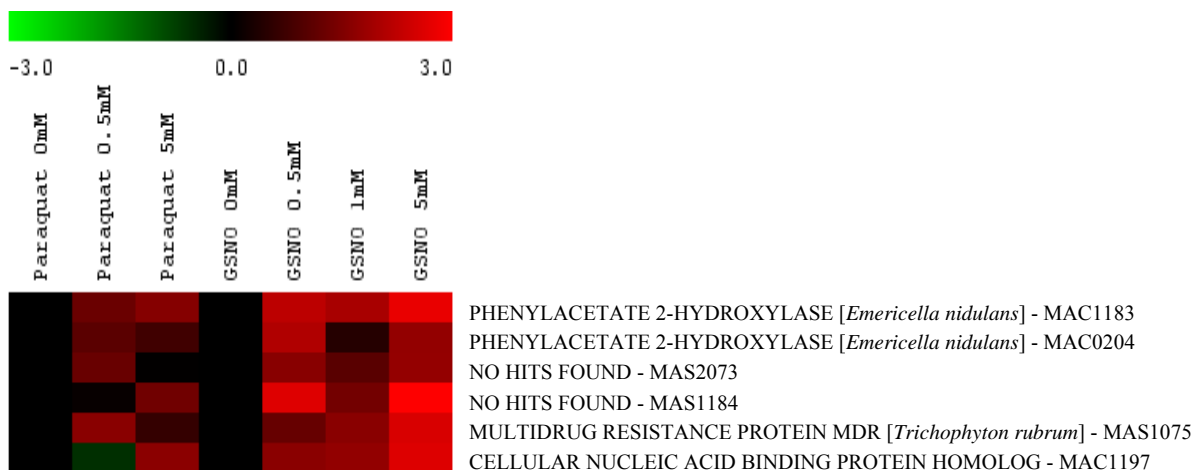
O mesmo procedimento foi adotado para “clusterização” dos 442 genes modulados a Paraquat<sup>®</sup> e GSNO, sendo o número total de “clusters” igual a 72 (Figura 49). No eixo x, são mostradas as diferentes concentrações de Paraquat<sup>®</sup> (0 mM, 0,5 mM e 5 mM) e GSNO (0

mM, 0,5 mM, 1 mM e 5 mM). Os grupos destacados por quadros vermelhos na figura 49 podem ser visualizados individualmente nas figuras 50 a 57.



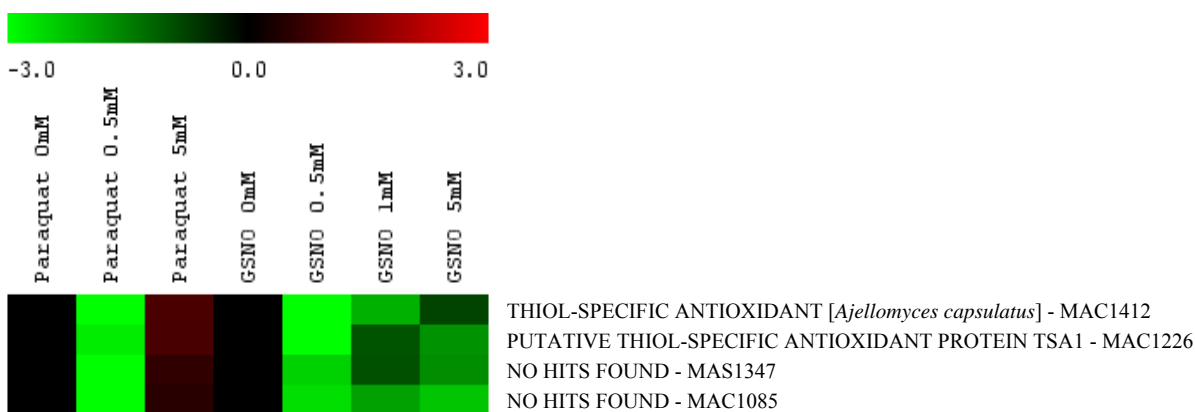
**Figura 49:** Agrupamentos de 442 genes com variação estatisticamente significativa, totalizando 72 “clusters”. Cada “cluster” é formado por genes com variações semelhantes na expressão, em exposição a diferentes concentrações de Paraquat® e GSNO. A disposição dos experimentos foi feita da seguinte forma: no eixo y a escala mostra a variação para cada “cluster” do logaritmo na base 2 da razão da expressão dos genes na cultura tratada e controle; no eixo x, da esquerda para direita, temos os dados de Paraquat® 0 mM, 0,5 mM, 5 mM, GSNO 0 mM, 0,5 mM, 1 mM e 5 mM respectivamente. Destacados por quadros vermelhos, 10 “clusters” que serão analisados individualmente. A numeração na parte inferior direita indica a ordem de cada “cluster”.

Os “clusters” 1 e 35 foram agrupados manualmente em uma só figura (Figura 50), onde podem ser vistos dois genes de fenilacetato 2-hidroxilase (MAC1183 e MAC0204) e um gene de uma proteína de resistência a multidrogas (MDR) (MAS1075), todos superexpressos em resposta à Paraquat® e GSNO. Este recurso foi utilizado, para colocar na mesma figura os dois genes da enzima fenilacetato 2-hidroxilase, que apresentam um padrão de expressão semelhante.



**Figura 50:** “Clusters” 1 e 35 destacados em vermelho na figura 49. É possível observar 6 genes, sendo 2 sem função conhecida (*No hits found*). Suas expressões estão aumentadas nos tratamentos com Paraquat® e GSNO.

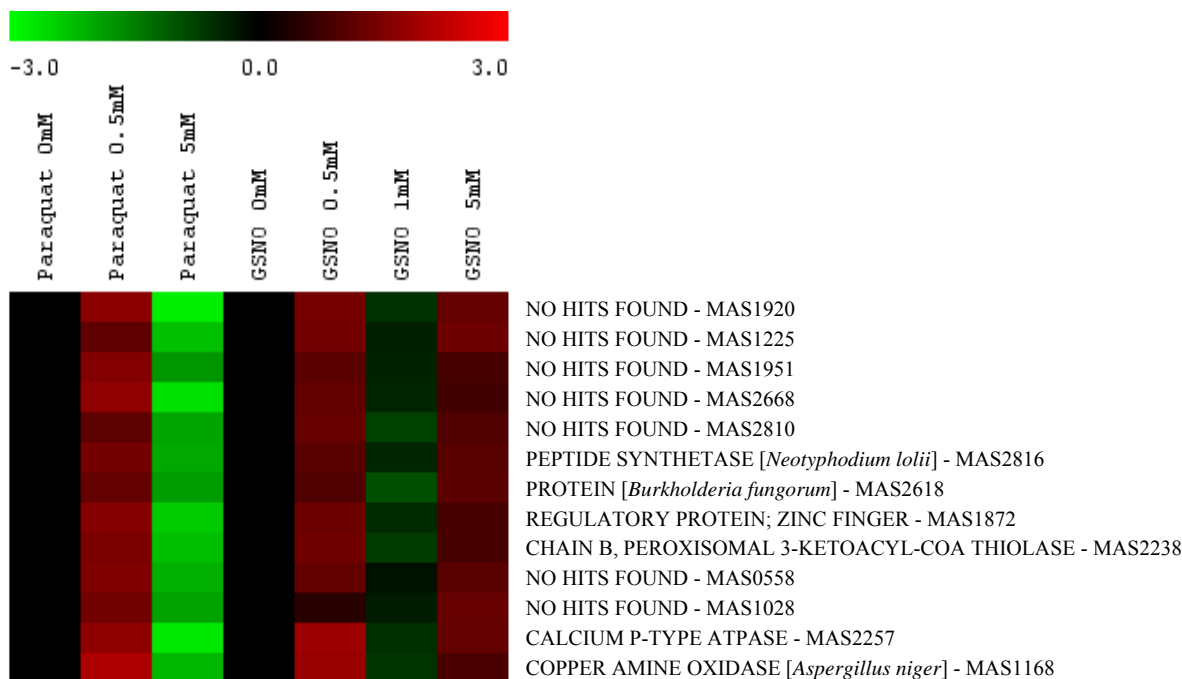
Na figura 51 outros dois “clusters” de números 17 e 52 foram agrupados manualmente em uma só figura e nele podem ser vistos novamente os dois genes de proteínas antioxidantes tiol-específicas (MAC1412 e MAC1226), além de duas seqüências sem função definida. Esta figura mostra subregulação dos genes em resposta à menor concentração de Paraquat® e as três de GSNO. Quando tratados com 5 mM de do primeiro agente oxidante, estes genes respondem com leve superexpressão. Aqui também foi utilizado o agrupamento manual para colocar na mesma figura os dois genes das proteínas antioxidantes tiol-específicas.



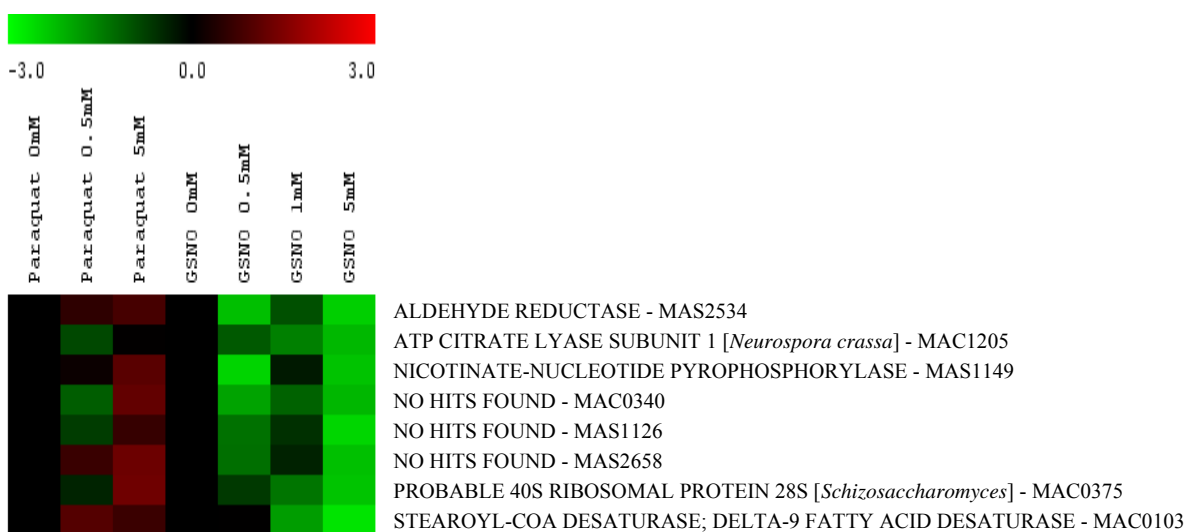
**Figura 51:** “Clusters” 17 e 52 destacados em vermelho na figura 49. É possível observar dois genes de antioxidante tiol específico (MAC1412 e MAC1226) e dois genes sem função conhecida (*No hits found*). Suas expressões estão diminuídas nos tratamentos com Paraquat® (0,5 mM) e GSNO.

O grupo 9 (Figura 52) apresenta 7 genes sem função definida (de um total de 13) e novamente o gene de cobre amino oxidase (MAS1168). Suas expressões estão aumentadas nos testes com Paraquat® 0,5 mM e GSNO 0,5 mM e 5 mM e diminuídas em resposta a 5 mM do primeiro e 1 mM do segundo agente.



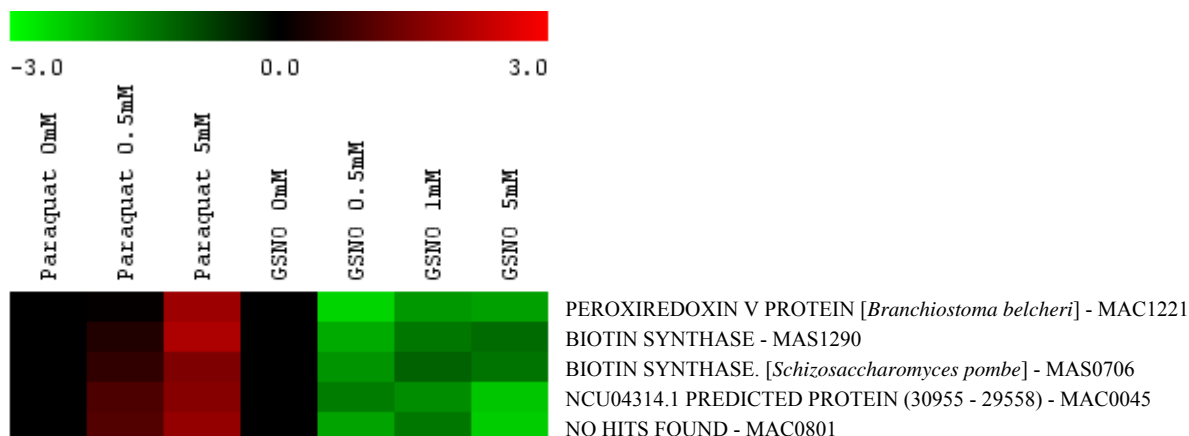


**Figura 52:** “Cluster” 09 destacado em vermelho na figura 49 apresenta 13 genes, sendo 7 sem função conhecida (*No hits found*). Suas expressões estão aumentadas nos tratamentos com Paraquat® 0,5 mM e GSNO 0,5 mM e 5 mM e diminuídas em 5 mM de Paraquat® e 1 mM de GSNO.

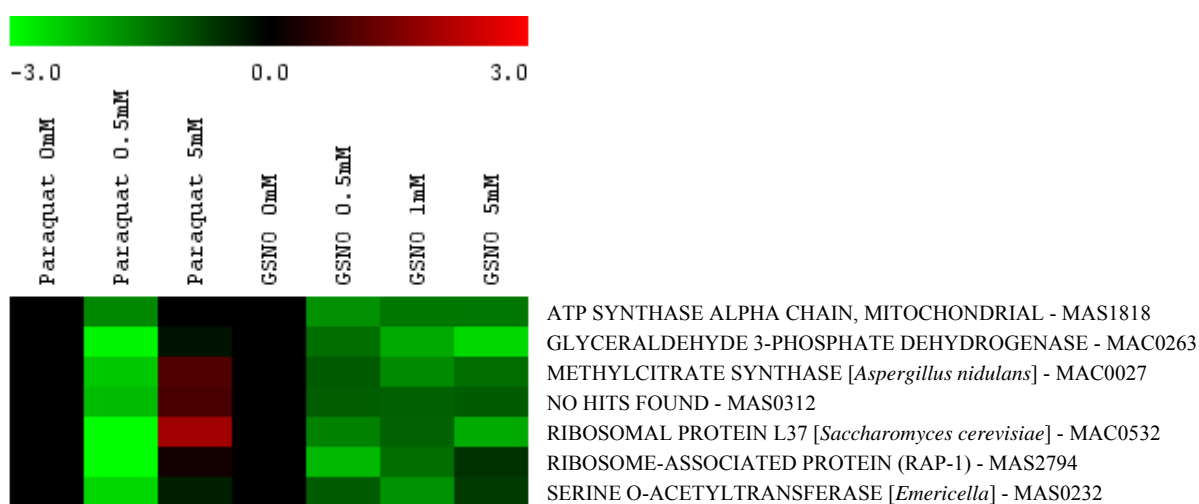


**Figura 53:** “Cluster” 14 destacado em vermelho na figura 49. É possível observar 8 genes, sendo 3 sem função conhecida (*No hits found*). Suas expressões estão levemente aumentadas nos tratamentos com Paraquat® e diminuídas em resposta a GSNO.

Um gene de aldeído redutase (MAS2534) pode ser visto no grupo 14 (Figura 53) com sua expressão levemente aumentada em resposta a Paraquat® e diminuída em resposta a GSNO. Com padrão de resposta semelhante podem ser observados os genes do “cluster” 18 (Figura 54), onde aparece novamente o gene de peroxirredoxina V (MAC1221) e dois da enzima biotina sintase (MAS1290 e MAS0706).

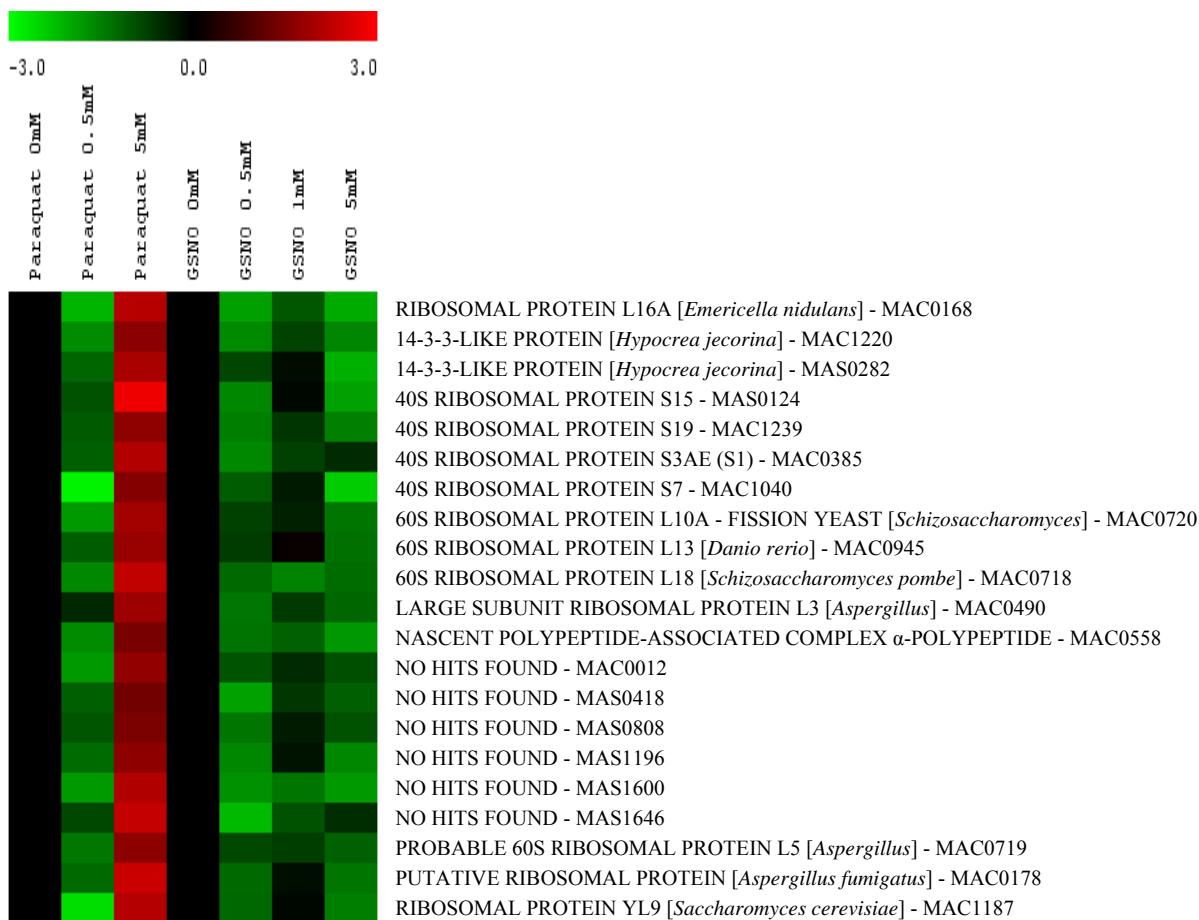


**Figura 54:** “Cluster” 18 destacado em vermelho na figura 49, apresenta 5 genes, destes, apenas 1 sem função conhecida (*No hits found*). Suas expressões estão aumentadas nos tratamentos com Paraquat® e diminuídas em resposta a GSNO.

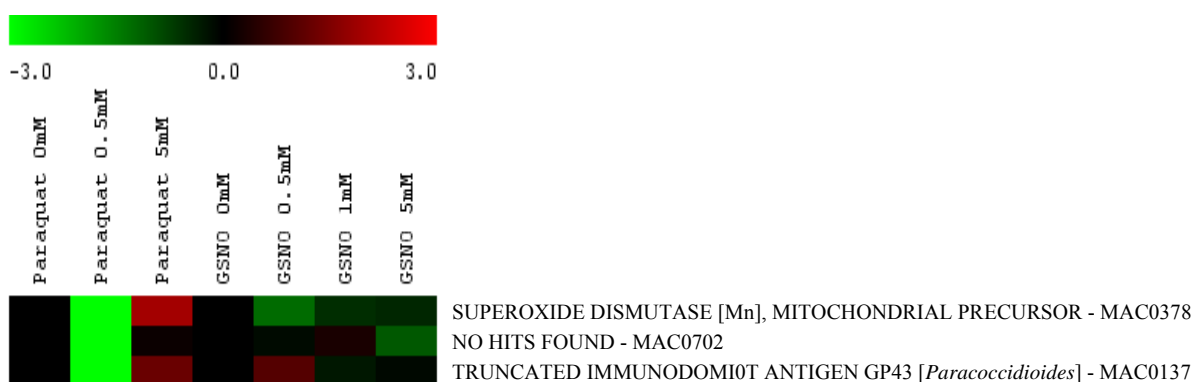


**Figura 55:** “Cluster” 19 destacado em vermelho na figura 49, apresenta 7 genes, destes, apenas 1 sem função conhecida (*No hits found*). Suas expressões estão diminuídas em resposta a Paraquat® 0,5 mM e GSNO.

Os genes da cadeia alfa da ATP sintase (MAS1818) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (MAC0263) aparecem novamente no grupo 19 (Figura 55) apresentando subregulação em resposta aos dois agentes. Além destes, dois genes de proteínas ribossomais (MAC0532 e MAS2794) são mostrados neste grupo com diminuição na expressão em resposta a 0,5 mM de Paraquat® e as três concentrações de GSNO; em resposta a 5 mM do primeiro agente existe um pequeno aumento na sua expressão. Este mesmo padrão pode ser visto no grupo 49 (Figura 56) onde aparecem 12 genes (de um total de 21 no “cluster”) de proteínas ribossomais (MAC0168, MAS0124, MAC1239, MAC0385, MAC1040, MAC0720, MAC0945, MAC0718, MAC0490, MAC0719, MAC0178 e MAC1187).



**Figura 56:** “Cluster” 49 destacado em vermelho na figura 49. É possível observar uma grande quantidade de genes de proteínas ribossomais, além de 6 genes sem função conhecida (*No hits found*). Suas expressões estão diminuídas nos tratamentos com GSNO e Paraquat® 0,5 mM e aumentadas em resposta a Paraquat® 5 mM.



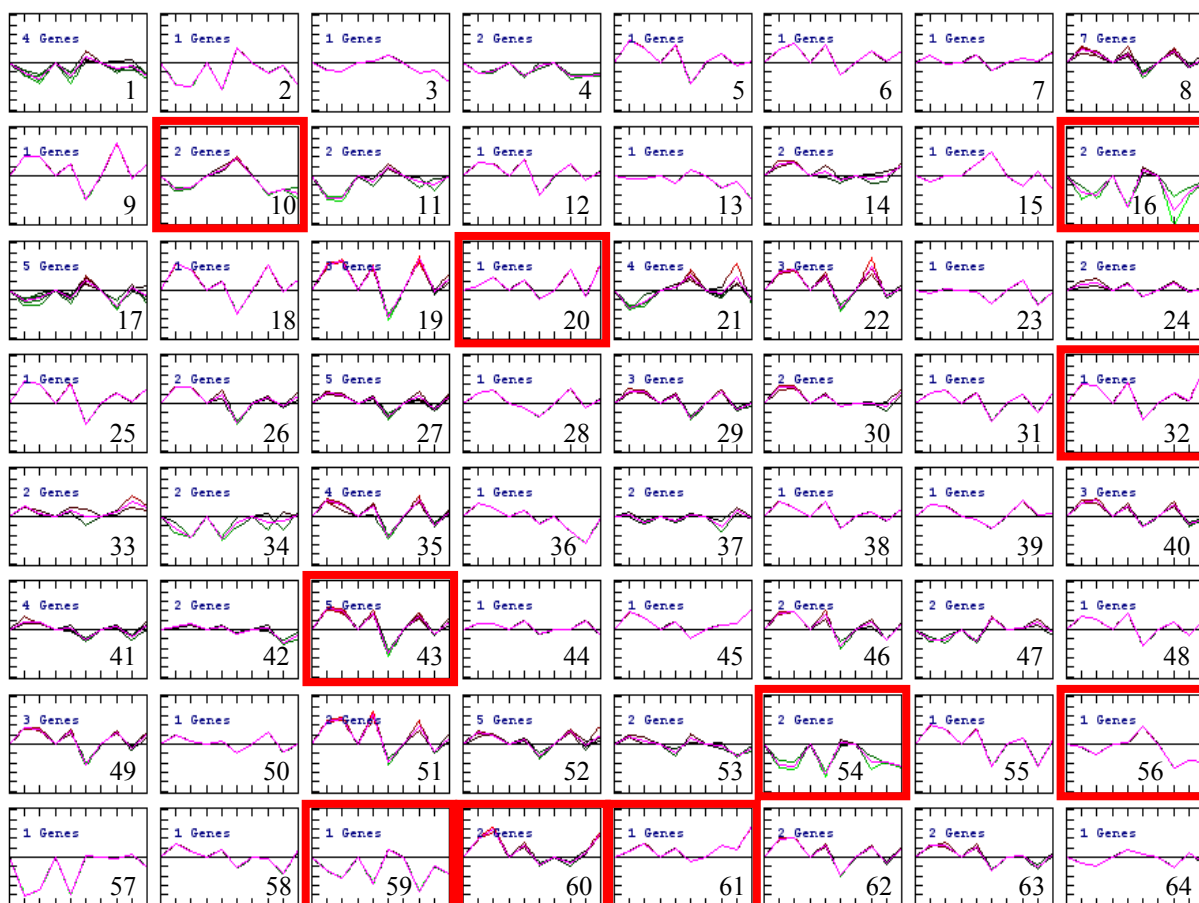
**Figura 57:** “Cluster” 59 destacado em vermelho na figura 49. É possível observar 3 genes, sendo um sem função conhecida (*No hits found*). Suas expressões estão bastante diminuídas nos testes com Paraquat® 0,5 mM, levemente aumentadas em resposta a Paraquat® 5 mM e com leve variação positiva e/ou negativa em resposta ao GSNO.

Na figura 57 (“cluster” 59) aparecem apenas três ESTs e um deles sem função conhecida. Os outros dois são da superóxido dismutase de manganês (MAC0378) e da glicoproteína gp43 (MAC0137). Todos apresentam forte subregulação em resposta a 0,5 mM de Paraquat®, leve aumento na expressão em resposta a 5 mM deste mesmo agente. Quando o fungo é tratado com GSNO, o gene de superóxido dismutase de manganês apresenta

diminuição na expressão em resposta as três doses, já o gene da gp43 apresenta leve aumento em resposta a 0,5 mM e diminuição em resposta às outras duas concentrações.

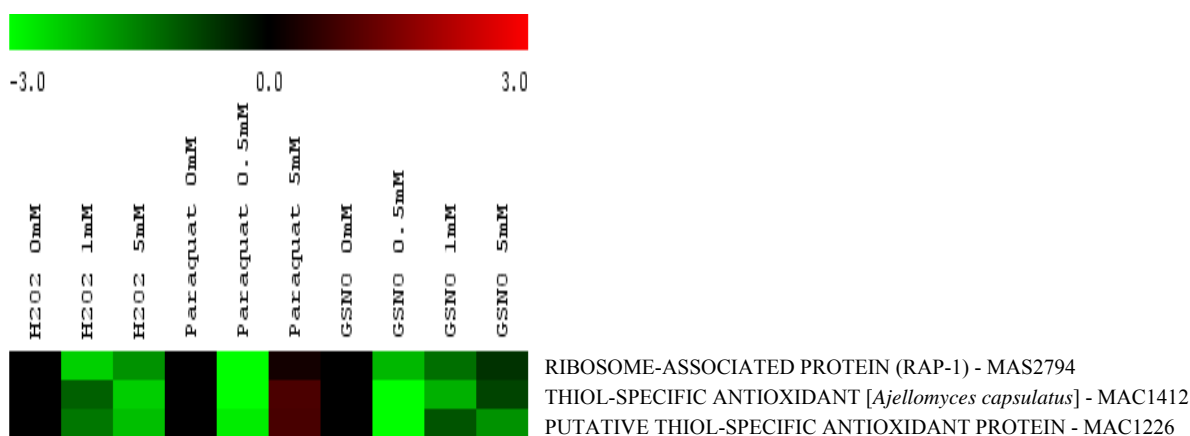
#### 4.3.4 AGRUPAMENTO DE GENES MODULADOS EM RESPOSTA A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PARAQUAT® E GSNO

O mesmo procedimento adotado anteriormente gerou uma figura de “clusterização” com 64 grupos de genes modulados em resposta aos três agentes oxidantes (Figura 58). No eixo x, são mostradas as diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0 mM, 1 mM e 5 mM), Paraquat® (0 mM, 0,5 mM e 5 mM) e GSNO (0 mM, 0,5 mM, 1 mM e 5 mM). Os grupos destacados por quadros vermelhos na figura 58 podem ser visualizados individualmente nas figuras 59 a 66.



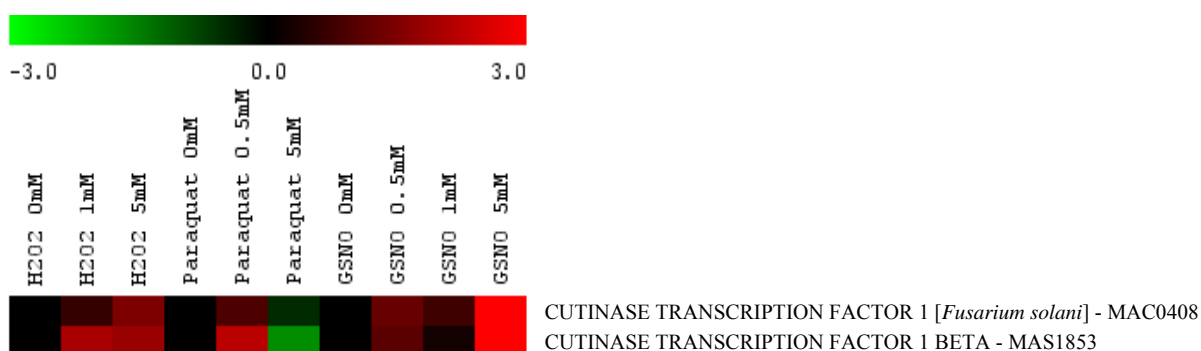
**Figura 58:** Agrupamentos de 128 genes com variação estatisticamente significativa, totalizando 64 “clusters”. Cada “cluster” é formado por genes com variações semelhantes na expressão, em exposição a diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Paraquat® e GSNO. A disposição dos experimentos foi feita da seguinte forma: no eixo y e a escala mostra a variação para cada “cluster” do logaritmo na base 2 da razão da expressão dos genes na cultura tratada e controle; no eixo x, da esquerda para direita, temos os dados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0 mM, 1 mM, 5 mM, Paraquat® 0 mM, 0,5 mM, 5 mM, GSNO 0 mM, 0,5 mM, 1 mM e 5 mM respectivamente. Destacados por quadros vermelhos, 10 “clusters” que serão analisados individualmente. A numeração na parte inferior direita indica a ordem de cada “cluster”.

Os “clusters” 16 e 59 foram agrupados manualmente em uma só figura (Figura 59), onde podemos ver três genes, o primeiro, um gene de uma proteína ribossomal (MAS2794) e depois, novamente os dois genes de proteínas antioxidantes tiol-específicas (MAC1412 e MAC1226). Neste grupo os genes respondem diminuindo suas expressões em resposta a  $H_2O_2$ , GSNO e 0,5 mM de Paraquat<sup>®</sup>, e com um leve aumento em resposta a 5 mM deste último.



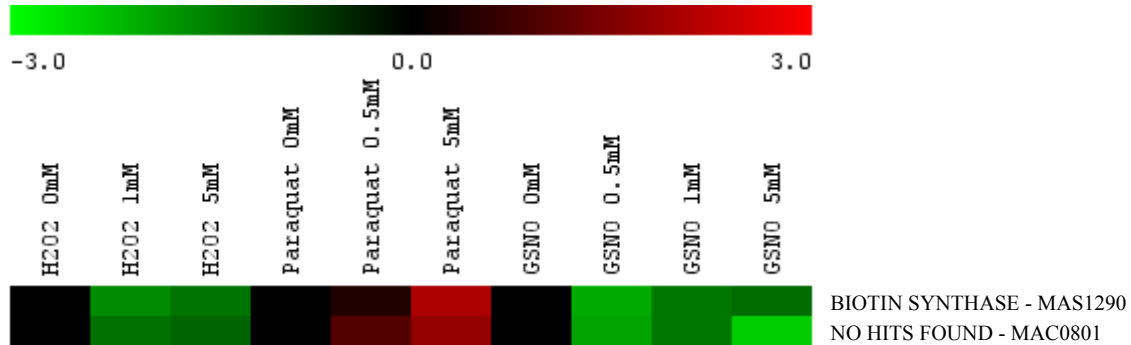
**Figura 59:** “Clusters” 16 e 59 destacados em vermelho na figura 58. É possível observar o gene de uma proteína ribossomal (MAS2794) e dois genes de antioxidante tiol específico (MAC1412 e MAC1226). Suas expressões estão diminuídas nos tratamentos com  $H_2O_2$ , Paraquat<sup>®</sup> 0,5 mM e GSNO.

De forma inversa, os genes do fator de transcrição 1 da cutinase (MAC0408 e MAS1853) presentes nos “clusters” 32 e 61, que foram agrupados em uma só figura (Figura 60), apresentam superexpressão em resposta a  $H_2O_2$ , GSNO e 0,5 mM de Paraquat<sup>®</sup>, enquanto estão subregulados em resposta a 5 mM deste agente oxidante.



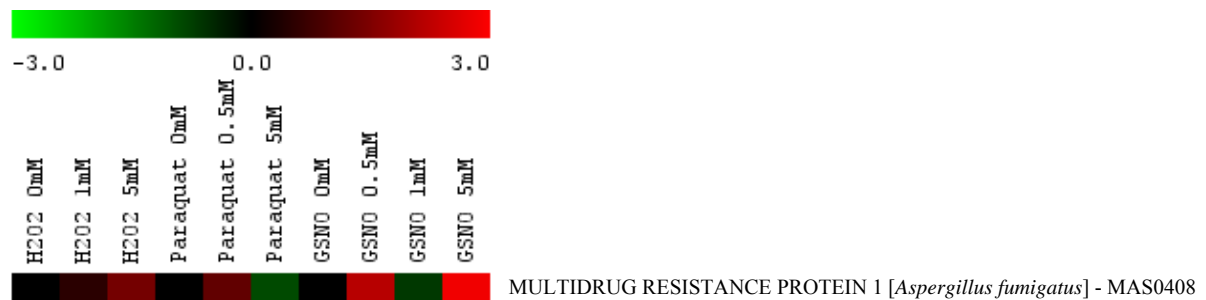
**Figura 60:** “Clusters” 32 e 61 destacados em vermelho na figura 58. É possível observar dois genes do fator de transcrição 1 da cutinase (MAC0408 e MAS1853). Suas expressões estão aumentadas nos tratamentos com  $H_2O_2$ , Paraquat<sup>®</sup> 0,5 mM e GSNO.

Na figura 61, podem ser vistos um gene da enzima biotina sintase (MAS1290) e outro sem função conhecida. Os dois estão subregulados em resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSNO e superexpressos em resposta a Paraquat<sup>®</sup>.



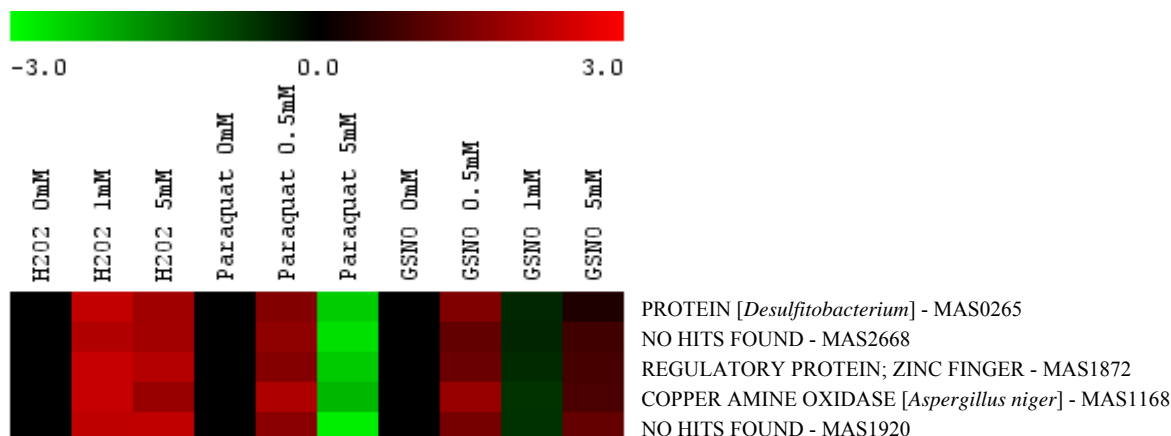
**Figura 61:** “Cluster” 10 destacado em vermelho na figura 58. É possível observar o gene de biotina sintase (MAS1290) e um gene sem função conhecida (*No hits found*). Suas expressões estão diminuídas nos tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSNO e levemente aumentadas em resposta a Paraquat<sup>®</sup>.

Outro gene de resistência a multidrogas (MDR1) (MAS0408) aparece no grupo 20 (Figura 62). Sua expressão está aumentada em resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,5 mM de Paraquat<sup>®</sup> e 0,5 mM e 5 mM de GSNO. Em resposta a Paraquat<sup>®</sup> 5 mM e GSNO 1 mM o gene apresenta subregulação.



**Figura 62:** “Cluster” 20 destacado em vermelho na figura 58. É possível observar o gene da proteína de resistência a multi-drogas (MAS0408). Sua expressão está aumentada em resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Paraquat<sup>®</sup> 0,5 mM e GSNO 0,5 mM e 5 mM.

No “cluster” 43 (Figura 63) aparece novamente o gene da enzima cobre amino oxidase (MAS1168). De forma semelhante à figura 62, os genes apresentam sua expressão aumentada em resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,5 mM de Paraquat<sup>®</sup> e 0,5 mM e 5 mM de GSNO. Em resposta a Paraquat<sup>®</sup> 5 mM e GSNO 1 mM os genes apresentam subregulação.



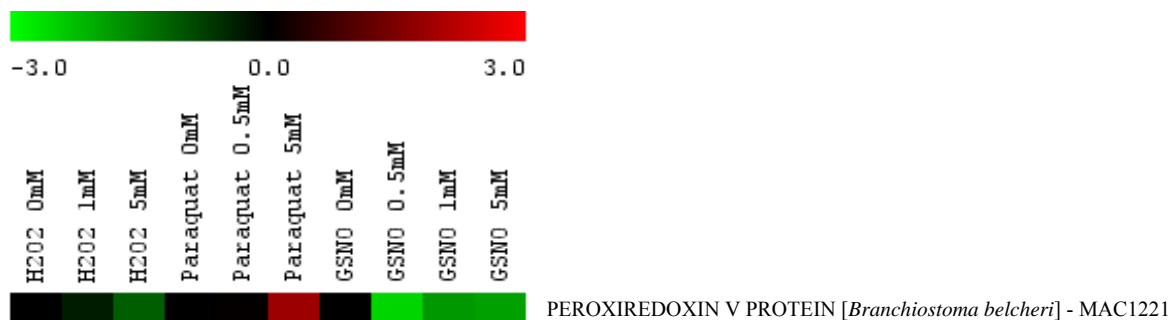
**Figura 63:** “Cluster” 43 destacado em vermelho na figura 58. É possível observar 5 genes, entre os quais, 2 sem função conhecida (*No hits found*). Suas expressões estão aumentadas nos tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Paraquat<sup>®</sup> 0,5 mM e GSNO e diminuídas em resposta a Paraquat<sup>®</sup> 5 mM e GSNO 1 mM.

O gene da enzima gliceraldeído 3-fosfato também aparece novamente no grupo 54, junto a um EST sem função conhecida (Figura 64), sua expressão está diminuída em resposta a todas as concentrações dos três agentes utilizados. No tratamento com 5 mM de Paraquat<sup>®</sup> a diminuição na sua expressão é mínima.



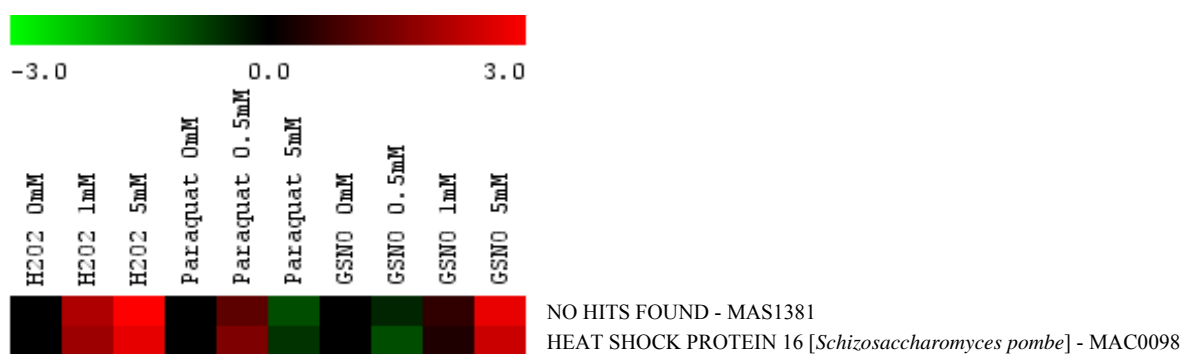
**Figura 64:** “Cluster” 54 destacado em vermelho na figura 58. É possível observar um gene sem função conhecida (*No hits found*) e o gene de gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (MAC0263). Suas expressões estão diminuídas nos tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Paraquat<sup>®</sup> e GSNO.

A figura 65 (“cluster” 56) apresenta apenas um gene, o da peroxirredoxina V (MAC1221) que apresenta subregulação em resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSNO. No tratamento com Paraquat<sup>®</sup> a resposta foi de aumento na expressão do gene.



**Figura 65:** “Cluster” 56 destacado em vermelho na figura 58. É possível observar o gene de peroxirredoxina V (MAC1221). Sua expressão está diminuída nos tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSNO e levemente aumentada em resposta a Paraquat® 5 mM.

A proteína de “heat shock” de 16 kDa volta a aparecer, agora no grupo 60 (Figura 66), onde seu gene apresenta-se superexpresso nos tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Paraquat® 0,5 mM, GSNO 1 mM e 5 mM. Em resposta a 5 mM de Paraquat® e 0,5 mM de GSNO o gene está subregulado.



**Figura 66:** “Cluster” 60 destacado em vermelho na figura 58. É possível observar um gene sem função conhecida (*No hits found*) e o gene da proteína de “heat shock” 16 (MAC0098). Suas expressões estão aumentadas nos tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Paraquat® 0,5mM, GSNO 1 mM e 5 mM e levemente diminuídas em resposta a Paraquat® 5 mM e GSNO 0,5 mM.



## 5. DISCUSSÃO

O patógeno termodimórfico *P. brasiliensis* tem como principal via de acesso ao organismo humano o sistema respiratório, e sua entrada leva à ativação do sistema imunológico com produção de interleucinas, anticorpos e fagocitose (PUCCIA e TRAVASSOS, 1991; ROONEY e KLEIN, 2002; LACAZ *et al.*, 2002; HORNBY *et al.*, 2004). Esta última é realizada por células especializadas como os macrófagos alveolares, que durante o processo liberam uma série de substâncias como EROs, ERNs e enzimas para tentar eliminar o fungo (BRUMMER *et al.*, 1988; BRUMMER *et al.*, 1989; GONZALEZ *et al.*, 2000; MISSALL, LODGE e McEWEN, 2004; ANDRADE *et al.*, 2005; FLAHERTY, MONICK e HINDE, 2006). Acredita-se também, que o macrófago é um ambiente pobre em fontes de glicose e aminoácidos, o que foi demonstrado pelo aumento na expressão de transportadores de membrana e diminuição na expressão de genes ligados ao metabolismo destas substâncias em *Cryptococcus neoformans* durante infecção em macrófagos murinos (FAN *et al.*, 2005). Este mesmo comportamento foi mostrado por *Candida albicans* internalizada em macrófagos de mamíferos (LORENZ, BENDER e FINK, 2004) e por *Listeria monocytogenes* infectando macrófagos murinos (CHATTERJEE *et al.*, 2006). A diminuição no metabolismo de glicose também foi demonstrada por Tavares e colaboradores (2007) através da diminuição na expressão de genes da glicólise em *P. brasiliensis* internalizado por macrófagos.

A liberação de EROs e ERNs é uma tentativa de degradar moléculas como proteínas, lipídeos e até mesmo o ácido nucléico dos patógenos (CURNUTTE, WHITTEN e BABIOR, 1974; NATHAN, 1987; DRAPIER, WIETZERBIN e HIBBS, 1988; JENDROSSEK *et al.*, 1997; FRIDOVICH, 1998; BOCCA *et al.*, 1998; GONZALEZ *et al.*, 2000). Moreira e colaboradores (2008) mostraram que a morte de leveduras de *P. brasiliensis* fagocitados por macrófagos murinos ativados por IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  é causada por mecanismos dependentes de EROs (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e ERNs (NO) e que inibidores destas espécies reativas aumentam a sobrevivência dos fungos. O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo que sobrevive no ambiente intracelular; assim, sua forma leveduriforme tem que minimizar os efeitos destas substâncias tóxicas presentes no fagossomo de células macrofágicas e, por esta razão, apresentam uma grande quantidade de proteínas e enzimas necessárias para sobrevivência e, conseqüentemente, virulência deste patógeno (SILVA *et al.*, 2008). A fase inicial destes mecanismos de defesa é a utilização de substâncias protetoras ou antioxidantes, também

chamadas de “scavengers”, que são oxidadas no lugar de outras macromoléculas de maior importância biológica, protegendo-as desta forma. Em seguida, estes “scavengers” devem ser reciclados ou repostos e enzimas que atuam diretamente nestes processos ou como detoxificadoras de radicais livres são produzidas, através do aumento na expressão de seus respectivos genes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Análises *in silico* de ESTs demonstraram que o *Paracoccidioides brasiliensis* possui diversos genes ligados a mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo, como superóxido dismutases, catalases, peroxidases, tioredoxinas, citocromo c peroxidase, enzimas de síntese de glutathione, entre outros (CAMPOS *et al.*, 2005). Tavares e colaboradores (2007) mostraram que após fagocitado, o *P. brasiliensis* modula a expressão de várias enzimas para combater o ambiente hostil gerado pelo macrófago, entre elas o aumento na expressão de Cu,Zn SOD, que atua diretamente na detoxificação de superóxidos, citocromo c oxidase, e diminuição na expressão de fosfofrutoquinase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, enolase, entre outras.

Substâncias geradoras de EROs como Paraquat<sup>®</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são frequentemente utilizadas em meios de cultivo *in vitro* para induzir e mimetizar esse ambiente de estresse oxidativo vivido dentro do macrófago e, assim, avaliar o comportamento destes microrganismos frente a este tratamento para identificar possíveis genes de adaptação e patogenicidade. Benabdellah e colaboradores (2009) observaram o aumento na expressão de um gene com sequência altamente similar a do gene de glutarrredoxina no fungo *Glomus intraradices* após tratamento com Paraquat<sup>®</sup>. Este mesmo aumento não foi observado quando o fungo foi tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O aumento na produção de superóxido dismutase foi medido por quimioluminescência em *Aspergillus niger* tratado com Paraquat<sup>®</sup> (BAI, HARVEY e McNEIL, 2001). Angelova e colaboradores (2005) demonstraram a modulação na expressão de SOD, catalase e glicose 6-fosfato desidrogenase em 12 espécies diferentes de fungos filamentosos tratando-os com Paraquat<sup>®</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Johnson e colaboradores (2003) verificaram o aumento na expressão da enzima oxidase alternativa em *Histoplasma capsulatum*, após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No entanto, avaliar genes específicos não leva ao entendimento global da defesa de patógenos, o ideal é que se proceda a uma análise mais ampla da resposta celular. Nesse momento, se faz importante uma técnica que permita uma análise genômica do patógeno, como a hibridação em microarranjos de DNA (HOFMAN, 2005).

Nunes e colaboradores (2005) construíram um “chip” de *P. brasiliensis* (Pb18) contendo 4692 ESTs e analisaram a transição micélio-levedura deste fungo, apontando modulação significativa de vários genes ligados à patogenicidade como genes de combate ao estresse oxidativo, metabolismo de parede celular, controle de crescimento, entre outros. A

técnica de microarranjos de DNA tem sido aplicada para analisar interações de bactérias e fungos com os fagócitos, identificando genes-chave para o desenvolvimento da patogenicidade e da virulência. Lorenz, Bender e Fink (2004) infectaram macrófagos de mamíferos com *Candida albicans* para analisar genes ligados à virulência e patogenicidade utilizando a técnica de microarranjos de DNA. Os resultados deste trabalho indicam aumento na degradação de ácidos graxos, na produção de enzimas de reparo de DNA, bem como genes de resposta ao estresse oxidativo e envolvidos com a síntese de aminoácidos. Fan e colaboradores (2005) mostraram o aumento na expressão de genes ligados ao estresse oxidativo, transporte de hexoses, aminoácidos e ferro, bem como no metabolismo de lipídeos de *Cryptococcus neoformans* fagocitado por macrófagos murinos. Tavares e colaboradores (2007) distribuíram 1152 produtos de PCR de uma biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis* (Pb01) em membranas de nylon e analisaram a transcrição inicial do fungo internalizado em macrófagos murinos, mostrando modulação na expressão de genes ligados ao estresse oxidativo, glicólise e outros.

A análise em microarranjos de DNA mostrou-se uma ferramenta poderosa na execução deste trabalho, gerando grande quantidade de resultados com ótima confiabilidade, que foi demonstrada através de análises por qPCR das expressões de alguns genes selecionados por terem sua função relacionada ao estresse oxidativo, e não necessariamente por serem os mais expressos. Segundo Miron e colaboradores (2006) a melhor e mais robusta estratégia é a escolha aleatória de genes para a validação, ao passo que a escolha dos genes mais expressos geralmente falha como estratégia de validação global. Esta técnica quantitativa possui alto grau de confiabilidade, no entanto é limitada a um ou poucos genes por experimento não servindo, portanto para uma análise genômica, mas é de grande utilidade para confirmar dados obtidos pela técnica de microarranjos de DNA. Dallas e colaboradores (2005) fizeram um trabalho de análise da expressão de 31 genes humanos por microarranjos de oligonucleotídeos e qPCR, mostrando forte correlação (correlação de Pearson = 0,89) em 87 % deles. Bracken e colaboradores (2008) verificaram, pela técnica de microarranjos de DNA, a variação na expressão de 3.800 genes de enterócitos de pacientes com doença celíaca, uma desordem inflamatória multifatorial do intestino causada pela ingestão de glúten por indivíduos geneticamente susceptíveis. Para confirmação dos dados por qPCR, estes pesquisadores utilizaram 10 genes selecionados aleatoriamente, dos 102 com modulação estatisticamente significativa, e obtiveram uma correlação qualitativa, comparando apenas superexpressão ou subregulação nas duas técnicas, sem levar em conta o nível de expressão, de 80 %, ou seja, 8 genes foram validados. Nunes e colaboradores (2005) confirmaram os

dados de 2.583 genes com modulação estatisticamente significativa nos experimentos de microarranjos de DNA, analisando a expressão por qPCR de 20 genes selecionados aleatoriamente durante a transição micélio-levedura de *P. brasiliensis*. Os seus resultados mostraram que houve uma correlação qualitativa em aproximadamente 81 % dos pontos analisados nas duas técnicas e as correlações de Pearson e/ou Spearman ficaram acima de 0,5 (indicando uma correlação moderada-alta) em 85 % dos casos. Em nosso trabalho, foram analisados por qPCR, 8 genes dos 740 com modulação estatisticamente significativa em resposta à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 12 genes dos 2070 com modulação estatisticamente significativa em resposta à Paraquat<sup>®</sup>. Os dados obtidos mostraram correlações quantitativas de aproximadamente 70 % ou superiores (correlações de Pearson de 0,6999 para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,7501 para Paraquat<sup>®</sup>); quando analisadas qualitativamente, as correlações foram maiores que 85 %, chegando a 100 % para os experimentos com Paraquat<sup>®</sup> o que atesta a confiabilidade dos dados de microarranjo de DNA deste trabalho.

## **5.1 GENES DE *Paracoccidioides brasiliensis* MODULADOS EM RESPOSTA A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Wang e colaboradores (2006) trataram *Candida albicans* com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM por 15 minutos e observaram, por análises de microarranjos de DNA, que genes como tiorredoxina redutase, glutathiona redutase, glutathiona S-transferase, NADPH desidrogenase, Mn-SOD, glicose 6-fosfato desidrogenase, transaldolase, flavina oxidoreductase NADH-dependente e álcool desidrogenase entre outros apresentaram aumento da expressão. Análises de proteínas de *Saccharomyces cerevisiae*, exposto a concentrações de 0,2 a 0,8 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 2 a 60 minutos utilizando eletroforese em gel bi-dimensional, mostraram o aumento na quantidade de enzimas antioxidantes como catalase, glutathiona redutase, tiorredoxinas, proteína antioxidante tiol-específica, e diminuição na quantidade de enzimas ligadas à glicólise e ciclo do ácido cítrico como piruvato descarboxilase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, malato desidrogenase e piruvato desidrogenase (GODON *et al.*, 1998). Ao analisar os 233 genes de *P. brasiliensis* que são modulados exclusivamente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem ser destacados genes com alguma ligação ao estresse oxidativo como o da enzima inositol 1-fosfato sintase (MAC0276) e piruvato desidrogenase quinase (MAS1973) que aparecem superexpressos, e de glicerol 3-fosfato desidrogenase (MAC1420), um regulador de inositol (MAC0673) e tiorredoxina (MAS0752) que aparecem sub-regulados nas duas concentrações testadas (não mostrados nas figuras detalhadas).

Várias moléculas sinalizadoras como o  $\text{Ca}^{2+}$  e o inositol tem se demonstrado como elementos importantes na sinalização de vias metabólicas relacionando a percepção de estresses com vários tipos de respostas gênicas (KNIGHT, TREWAVAS e KNIGHT, 1996; KNIGHT, TREWAVAS e KNIGHT, 1997; TAKAHASHI *et al.*, 2001). O gene da enzima inositol 1-fosfato sintase (MAC0276), que está com sua expressão aumentada 2,1 vezes em resposta à  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM e 1,7 vezes a 5 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , produz a enzima que catalisa a conversão de glicose 6-fosfato em inositol 1-fosfato que posteriormente é defosforilado a inositol por enzimas fosfatases [inositol polifosfato 5-fosfatase (MAS0757)] (KEGG, 2008). Yang e colaboradores (2008) mostraram o aumento da tolerância ao estresse oxidativo causado por  $\text{H}_2\text{O}_2$  em plantas de tabaco transgênico expressando constitutivamente o gene de inositol polifosfato 6-/3-quinase clonado de *Arabidopsis thaliana*. A estimulação da sinalização celular dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  pode ocorrer por meio do aumento da concentração deste íon no citosol em resposta a agentes oxidantes (SUZUKI, FORMAN e SEVANI, 1997). Monnier e colaboradores (2002) mostraram que a ativação da via metabólica do inositol, com a superexpressão da inositol tri-fosfato quinase modificando a homeostase de cálcio, foi capaz de combater o estresse oxidativo causado por  $\text{H}_2\text{O}_2$  em *Drosophila melanogaster (in vivo)*, mas não o fez quando o estresse foi induzido por Paraquat<sup>®</sup>. O aumento da expressão do gene da cadeia A da enzima inositol polifosfato 5-fosfatase (MAS0757), que faz parte da via de produção do inositol não teve significância estatística em resposta ao peróxido de hidrogênio, embora sua expressão estivesse aumentada de 1,2 a 2,1 vezes em todas as réplicas experimentais. Já em resposta a Paraquat<sup>®</sup> a diminuição na sua expressão é estatisticamente significativa, o que corrobora os dados de Monnier e colaboradores (2002).

A enzima piruvato desidrogenase quinase (MAS1973) faz parte do complexo de enzimas piruvato desidrogenase que é responsável pela conversão de piruvato a acetil CoA, reciclando  $\text{NAD}^+$  a NADH, a expressão do seu gene está aumentada 2,7 vezes em resposta a 1 mM e 2,8 vezes a 5 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Este complexo enzimático foi descrito como alvo de oxidação, perdendo sua função em situações de estresse oxidativo como o causado em reperfusion após isquemia cerebral (MARTIN, ROSENTHAL e FISKUM, 2005). Assim, o aumento na produção das enzimas do complexo pode ser justificado como reposição e manutenção da atividade deste complexo. Ao mesmo tempo, a reciclagem de NADH é de grande importância para situações de estresse oxidativo, onde esta co-enzima é freqüentemente oxidada (STRYER, 1992; KEGG, 2008).

Larsson e colaboradores (1998) demonstraram que a lançadeira (*shuttle*) de glicerol 3-fosfato é ativa na manutenção do balanço redox citosólico em *Saccharomyces cerevisiae*, no

entanto, o gene de glicerol 3-fosfato desidrogenase (MAC1420) está com sua expressão diminuída 2 vezes em resposta a 1 mM e 2,8 vezes a 5 mM de  $H_2O_2$  em *P. brasiliensis*. Esta lançadeira situada na membrana interna da mitocôndria tem seu sítio catalítico voltado para o citoplasma, onde a co-enzima NADH é oxidada a  $NAD^+$  pela glicerol 3-fosfato desidrogenase quando esta cataliza a redução de dihidroxiacetona fosfato a glicerol 3-fosfato. Outra glicerol 3-fosfato desidrogenase, ancorada na lançadeira, oxida o glicerol 3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato, transferindo estes elétrons para a cadeia respiratória com a redução de FAD a  $FADH_2$ . Esta seria uma forma de manutenção do balanço redox pelo fungo durante seu crescimento anaeróbico; no entanto, estes mesmos experimentos mostraram que mutantes que não possuem a enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase não tiveram nenhum prejuízo no seu crescimento, utilizando, portanto, outra via para a obtenção de energia e manutenção do equilíbrio, como a NADH desidrogenase citosólica (LARSSON *et al.*, 1998). A lançadeira de glicerol 3-fosfato e a NADH desidrogenase são as vias mais importantes para oxidação do NADH e transferência de seus elétrons para a cadeia respiratória, assim o papel destas enzimas na manutenção do equilíbrio redox é a etapa de oxidação (RIGOULET *et al.*, 2004), sendo coerente sua inibição em resposta ao estresse oxidativo, o que evitaria a formação de mais espécies oxidadas ( $NAD^+$ ) no citoplasma.

Tiorredoxina (MAS0752) é polipeptídeo encontrado tanto em procariotos quanto em eucariotos que possui dois grupos  $-SH$  adjacentes na sua forma reduzida, que são convertidos a dissulfeto na sua forma oxidada. A tiorredoxina faz parte, em conjunto com enzimas peroxidases, de uma via que desempenha um papel de alta importância na detoxificação de peróxidos (FRIDOVICH, 1998; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000; EBRAHIMIAN e TOUYZ, 2008). Foi demonstrado inclusive, que a tiorredoxina pode reagir diretamente com  $H_2O_2$  diminuindo a citotoxicidade deste agente em células endoteliais de camundongos (NAKAMURA *et al.*, 1994). Desta forma, a subregulação desta enzima é inesperada em uma situação de estresse oxidativo causada por peróxido. Kim e colaboradores (2007) mostraram o aumento na resistência de leveduras de *Schizosaccharomyces pombe* contendo o gene de tiorredoxina (TRX3) clonado, em relação ao controle (sem o gene TRX3), quando crescidas em meio sólido mínimo acrescido de  $H_2O_2$  1 mM. Em *Saccharomyces cerevisiae* foram encontrados dois genes de tiorredoxina (TRX1 e TRX2), e a superexpressão de TRX1 ou TRX2 aumenta a resistência ao estresse oxidativo das leveduras que crescem em meio sólido de forma semelhante quando expostas, ou não, a 11 mM de  $H_2O_2$  (GARRIDO e GRANT, 2002). No entanto, Traverso e colaboradores (2007) clonaram separadamente dois genes de tiorredoxina (TRXh1 e TRXh2) de ervilhas (*Pisum sativum*) em *Saccharomyces cerevisiae*

deficientes para os genes destas enzimas e observaram comportamentos diferentes nos fungos. O gene TRXh1 mostrou-se envolvido no controle do balaço redox, com possíveis interações com peroxirredoxinas, enquanto o gene TRXh2 causou um fenótipo de hipersensibilidade a  $H_2O_2$  na levedura mutante. A partir destes dados os autores sugerem diferentes funções para diferentes isoformas de tiorredoxina em plantas.

Os genes de outras peroxidases também aparecem subregulados, em resposta a  $H_2O_2$ , tais como antioxidante tiol-específico (MAC1412 e MAC1226 – Figuras 16, 40, 45, 51 e 59), peroxirredoxina (MAC1221 – Figuras 17, 28, 48 e 54) e um membro da família da glutarredoxina (MAS2032 – Figura 37) ou não tem expressão estatisticamente significativa como o da glutathiona peroxidase (MAC0436 – Figura não mostrada), sendo superexpressos apenas quando o fungo é submetido à Paraquat<sup>®</sup> (notadamente em resposta a 5 mM deste agente). Estas proteínas e enzimas fazem parte de uma cadeia de detoxificação de peróxidos, que envolve ainda tiorredoxina peroxidase, tiorredoxina redutase, ou suas homólogas, glutarredoxina peroxidase e glutarredoxina redutase, além de  $FADH_2/FAD^+$  e  $NADPH/NADP^+$ . Esta cadeia culmina com o transporte de elétrons do agente oxidante até  $NADPH$ , convertendo-o em  $NADP^+$  (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). À primeira vista esta subregulação frente ao estresse com  $H_2O_2$  parece incoerente. No entanto, o peróxido de hidrogênio na presença de metais de transição como ferro e principalmente cobre é rapidamente convertido em radical hidroxil (Fe:  $K_2=76 M^{-1} s^{-1}$ ; Cu:  $K_2=4,7 \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$ ) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000), assim, o mais provável é que o fungo quando tratado com este agente ative mecanismos de defesa contra radicais hidroxil e não peróxido. Já quando tratado com Paraquat<sup>®</sup>, a formação de  $H_2O_2$  ocorre dentro da levedura, fazendo com que estas enzimas sejam ativadas para combatê-lo.

Em resposta a GSNO estes genes não têm sua expressão alterada de maneira estatisticamente significativa (MAC0436 e MAS2032) ou estão subregulados (MAC1221, MAC1226 e MAC1412) (PIMENTEL, 2007). A utilização de peroxidases para combater ERNs já foi demonstrada em vários trabalhos (BRYK, GRIFFIN e NATHAN, 2000; REINARTZ *et al.*, 2008; SILVA, PROENÇA e COUTINHO, 2008), no entanto um trabalho com *Helicobacter pylori* mostrou que nem todas as peroxidases têm função na detoxificação de espécies geradas por GSNO (COMTOIS, GIDLEY e KELLY, 2003). Em um estudo com *Schizosaccharomyces pombe* tratado com GSNO foi demonstrado que este agente provocou a oxidação de glutathionas e inativou a glutathiona peroxidase (SAHOO *et al.*, 2006).

## 5.2 GENES DE *Paracoccidioides brasiliensis* MODULADOS EM RESPOSTA A PARAQUAT®

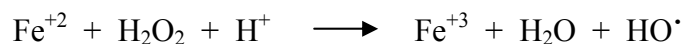
Quando o estresse oxidativo foi causado por Paraquat®, verificou-se que 2070 genes responderam de forma estatisticamente significativa e destes, 1315 respondem exclusivamente a este agente (em relação a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSNO). Entre estes, é possível destacar o gene de superóxido dismutase de Cu/Zn (MAC0567 – Figura 28) que aparece superexpresso principalmente em resposta à maior concentração utilizada (5 mM). As superóxido dismutases catalisam a transformação de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e são componentes fundamentais na defesa celular contra o estresse causado por superóxidos (FRIDOVICH, 1995). Existem quatro tipos de SODs relatados, baseados nos metais presentes no seu sítio ativo: superóxido dismutase de cobre-zinco (Cu/Zn-SOD), superóxido dismutase de manganês (Mn-SOD), superóxido dismutase de ferro (Fe-SOD) e superóxido dismutase de níquel (Ni-SOD), sendo esta última descrita em *Streptomyces griseus* (FRIDOVICH, 1998; MATES e SANCHEZ-JIMENES, 1999). Organismos procarióticos, tipicamente, possuem Fe-SOD e Mn-SOD, enquanto células eucarióticas possuem a enzima Mn-SOD localizada na mitocôndria e Cu/Zn-SOD no citosol (FRIDOVICH, 1998).

A superexpressão dos genes de Cu/Zn-SOD (MAC0567 – Figura 28), Mn-SOD (MAC0378 – Figura 57, MAC1209 – Figura não mostrada) e Fe-SOD (MAS1151 – Figuras 15 e 38) se deu em resposta à exposição à Paraquat®, com sub-regulação em resposta à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figuras 15 e 38) e GSNO (Figura 57). Isto serve, neste caso, como um controle de que a formação de superóxido realmente ocorreu e o fungo acionou seus mecanismos de defesa. Li e Yu (2007) clonaram o gene de Cu/Zn-SOD de *Saccharomyces cerevisiae* em *Pichia pastoris* e mostraram que sua superexpressão aumenta a resistência destas a Paraquat®. A superexpressão de SOD foi mostrada por Angelova e colaboradores (2005) em 12 espécies de fungos filamentosos tratados com Paraquat®. A SOD da arquea *Methanosarcina barkeri* também teve sua expressão aumentada em resposta ao tratamento com Paraquat® (BRIOUKHANOV, NETRUSOV e EGGEN, 2006). Vê-se, no entanto, que tal ativação ocorreu somente após a exposição da cultura a uma concentração de 5 mM, sugerindo que o *P. brasiliensis* possui outros mecanismos de proteção que conseguem rechaçar quantidades menores de superóxidos sem que altos níveis destas enzimas dismutases estejam presentes. É possível que a dismutação de baixos níveis de superóxidos seja realizada pela quantidade basal de SOD presente na célula e/ou por receptores diretos de elétrons, por meio de um



sistema não enzimático, como ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, carotenóides e quelantes de metais como ferro e cobre (SIES, 1997).

Também é possível observar a expressão diferencial de dois genes de álcool oxidase (MAS2355 e MAS0546 – Figura não mostrada) e dois de redutase férrica (MAC0905 e MAS0756 – Figura não mostrada) que aparecem superexpressos em resposta à concentração de 0,5 mM e sub-regulados em 5 mM. A enzima álcool oxidase (MAS2355 e MAS0546) catalisa a reação de um álcool com  $O_2$  para formar um aldeído. No entanto, um segundo produto desta reação é o  $H_2O_2$ , assim a sub-regulação desta enzima em resposta a 5 mM de Paraquat<sup>®</sup> evitaria a formação de mais EROs (DANIEL *et al.*, 2007; KEGG, 2008). Na concentração de 0,5 mM de Paraquat<sup>®</sup>, o aumento na expressão desta enzima pode estar relacionado ao baixo estresse oxidativo sofrido nesta situação, como pode ser visto na curva de crescimento do fungo na presença deste agente (Figura 20). É possível observar que existe uma inibição do crescimento, no entanto, pequena e com uma marcada fase exponencial, que não aparece no tratamento com 5 mM do mesmo agente. Até o momento não foram encontrados trabalhos relacionando a expressão desta enzima com situações de estresse oxidativo. Já a redutase férrica (MAC0905 e MAS0756) tem o papel de reduzir e solubilizar o  $Fe^{3+}$ , fornecendo o substrato para os transportadores de ferro de alta e baixa afinidade, que são específicos para  $Fe^{2+}$ ; além disso, esta proteína parece reduzir também o cobre, inclusive sendo reprimida sua expressão na presença deste metal (HASSET e KOSMAN, 1995). Durante o estresse oxidativo, a homeostasia de metais como o cobre e o ferro na célula é bastante importante, pois a alta concentração destes metais de transição, na presença de peróxido de hidrogênio, leva a formação de novas espécies reativas de oxigênio, os radicais hidroxil, como pode ser visto na reação de Fenton (CROSS *et al.*, 2003; VALAVANIDIS, VLAHOYIANNI e FIOTAKIS, 2005):



Tanto o excesso quanto a falta de ferro podem promover o estresse oxidativo. Bactérias e fungos mutantes no metabolismo de ferro (com excesso ou falta deste metal) são mais sensíveis ao estresse oxidativo e em alguns casos hipovirulentos, sugerindo uma relação crítica e direta do metabolismo e aquisição do ferro com a interação parasita-hospedeiro (NYHUS e JACOBSON, 1999). Nossos dados mostram que em baixa concentração de Paraquat<sup>®</sup>, a redutase férrica é mais expressa, aumentando o aporte de  $Fe^{2+}$  disponível. Já em uma concentração mais crítica, onde grande quantidade de  $H_2O_2$  está sendo gerado pela superóxido dismutase, o seu gene fica sub-regulado, provavelmente a fim de evitar a reação de Fenton, assim como aconteceu com a enzima álcool oxidase. Um trabalho com

*Cryptococcus neoformans*, uma levedura patogênica que causa meningite em pacientes imunodeprimidos, mostra que mutantes para o gene de redutase férrica com superprodução desta enzima, tem maior sensibilidade ao estresse oxidativo (NYHUS e JACOBSON 1999). Como defesa fúngica uma proteína transportadora de cobre (MAC 0197 – Figuras 14 e 43) que aparece superexpressa em resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSNO, pode estar também relacionada à situação de estresse oxidativo para a manutenção da homeostasia do cobre intra e extracelular, além de o íon cobre servir como co-fator de enzimas como a superóxido dismutase de cobre e zinco (SITTHISAK *et al.*, 2005).

Neste experimento ainda é possível observar que 3 genes de proteínas de “heat shock” responderam de forma exclusiva a Paraquat<sup>®</sup>, duas de 60 kDa (MAS1469 e MAS0296 – Figura não mostrada) e uma de 70 kDa (MAC0483 – Figura 29). Todas têm sua expressão diminuída em resposta a 0,5 mM e aumentada em 5 mM. Os genes de proteínas da família “heat-shock” possuem um perfil de expressão variado, são proteínas responsáveis pelo dobramento (*folding*) e ativação de outras. Este grupo de proteínas tem sido descrito em vários modelos, modulado positivamente, em situações de estresse oxidativo (TU *et al.*, 2005; SAH *et al.*, 2005; JAYARAJ, ANAND e RAO, 2006) mostrando efeito protetor imediato (HSP 70), com a diminuição de citocinas (GRUNENFELDER *et al.*, 2001). Tavares e colaboradores (2007) mostraram o aumento de HSP 60 em *P. brasiliensis* durante a infecção de macrófagos murinos. A superexpressão de HSP 60, HSP 70 e HSP 90, individualmente ou combinadas, fornecem uma proteção diferencial em células neuronais humanas contra o estresse causado pelo acúmulo da proteína β-amilóide (que causa a degeneração neuronal observada em tecidos de pacientes com Mal de Alzheimer), pela manutenção da fosforilação oxidativa e da funcionalidade do ciclo do ácido tricarbóxico (VEERESHWARAYYA *et al.*, 2006). Na figura 29, é possível ver que houve diminuição na expressão da HSP 70 e de duas HSP mitocondriais (MAC0138 – 10 kDa e MAC1137) em resposta a 0,5 mM e aumento em resposta a 5 mM de Paraquat<sup>®</sup>, mostrando que, assim como aconteceu com a superóxido dismutase, em baixas condições de estresse esta defesa pode não ser utilizada, ou não é necessário aumentar a expressão destes genes para neutralizar as espécies reativas presentes. A proteína HSP 30 (MAC0784) aparece superexpressa em resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSNO (Figuras 12 e 43), enquanto a HSP 16 (MAC0098) se mostra superexpressa em resposta aos três agentes (Figuras 14, 43 e 66). Muller, Gauley e Heikkila (2004) demonstraram o aumento na produção de HSP 30 em células do epitélio renal de *Xenopus laevis* como resposta a peróxido de hidrogênio.

Respondendo de forma exclusiva a Paraquat<sup>®</sup> e com aumento na expressão, pode ser destacado o gene de histidina quinase (MAS1722 – Figura não mostrada). Conforme descrito anteriormente, homólogos do gene da histidina quinase foram encontrados em *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* e *C. immitis*. Este gene pertence a um grupo de proteínas de transdução de sinal utilizadas para responder a sinais ambientais e controlar o processo de desenvolvimento. As seqüências e os domínios chave desta proteína são altamente conservados em *H. capsulatum* e *C. immitis*. Além da presença em múltiplas espécies, a função desta proteína também está conservada nos fungos *B. dermatitidis* e *H. capsulatum*, organismos em que regula o dimorfismo e a expressão de genes de virulência e patogenicidade, o que sugere que ela possa desempenhar esta função em outros fungos dimórficos (VENANCIO *et al.*, 2002). No trabalho de Nunes e colaboradores (2005) não foi possível observar a resposta do gene de histidina quinase durante a transição dimórfica de *P. brasiliensis*, pois sua modulação não foi estatisticamente significativa. No entanto, nossos resultados mostram a superexpressão deste gene em resposta a Paraquat<sup>®</sup>, assim este gene pode ser ligado à virulência e patogenicidade também em *P. brasiliensis*, uma vez que quando exposto a uma situação de estresse oxidativo, o gene de histidina quinase é ativado. Mutantes de *Streptococcus mutans* com o gene de histidina quinase deletado se mostraram hipovirulentos e menos resistentes ao estresse oxidativo (LEVESQUE *et al.*, 2007). Em leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* e *Candida lusitaniae* os reguladores de histidina quinase se mostraram extremamente importantes durante situações de estresse oxidativo (RUPRICH-ROBERT *et al.*, 2008).

Dois genes que também chamam a atenção são os da glicoproteína 43 (gp43) (MAC0137 e MAC0957 – Figuras 31 e 57). Esta glicoproteína tem grande significado imunológico e foi caracterizada por Puccia e colaboradores (1986). Mendes-Giannini e colaboradores (1989) detectaram a presença de gp43 no soro de pacientes com paracoccidiodomicose e em 1990 mostraram que ela desaparecia desses pacientes após evolução clínica favorável pela medicação antifúngica, mostrando-se como um importante marcador sorológico da eficiência terapêutica. Almeida e colaboradores (1998) mostraram a participação ativa da gp43 na ligação de leveduras de *P. brasiliensis* com macrófagos de camundongos BALB/c infectados experimentalmente. Vicentini e colaboradores (1994) mostraram que a gp43 está diretamente ligada ao processo de adesão do fungo a células epiteliais através de uma proteína de matrix extracelular chamada laminina, ligando esta glicoproteína à patogenicidade do fungo. A ligação de células fúngicas dependente de gp43 à laminina aumenta a patogenicidade deste fungo *in vivo* e estudos com anticorpos monoclonais

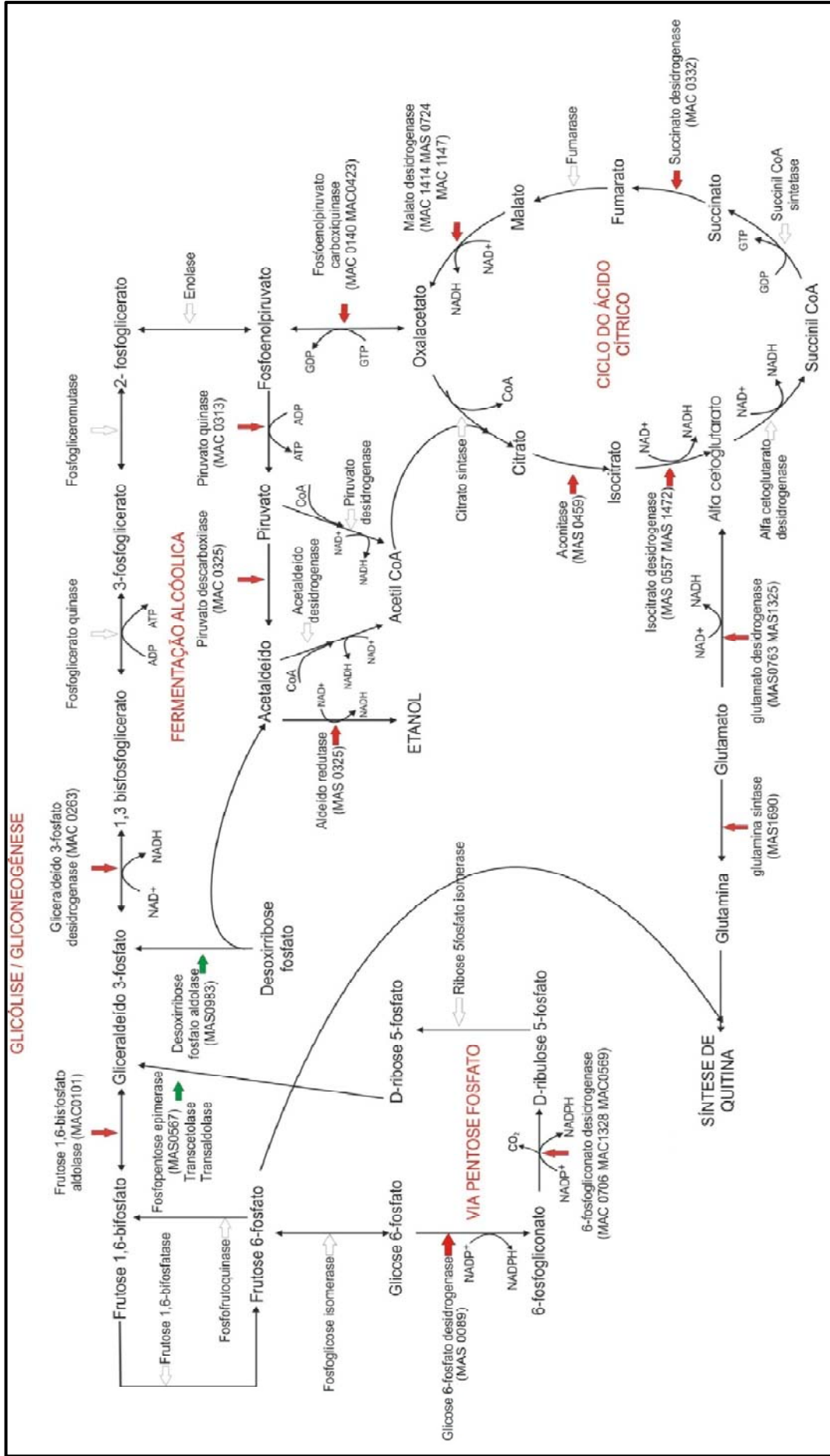
contra gp43 confirmaram sua ligação à patogenicidade *in vivo* (GESZTESI *et al.*, 1996). Estudos têm sido realizados na tentativa de desenvolver uma vacina contra a paracoccidiodomicose e o principal alvo é a gp43, com resultados bem sucedidos inclusive para uma vacina de DNA com o gene desta glicoproteína (PINTO *et al.*, 2000). A expressão de gp43 está fortemente reprimida (mais que 200 vezes) em resposta a 0,5 mM de Paraquat<sup>®</sup>, não apresenta resultados estatisticamente significativos em resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e modulação desconsiderável na sua expressão em resposta a 1 mM e 5 mM de GSNO. Em resposta a 5 mM de Paraquat<sup>®</sup> e 0,5 mM de GSNO os genes de gp43 apresentaram aumentos pouco maiores que 2 vezes nas suas expressões. Estes dados combinam com o aumento da expressão dos genes de biossíntese de quitina (que será discutida posteriormente), e sugerem que além de aumentar a espessura da parede, o fungo produz mais gp43 quando está sendo atacado por superóxidos, para aumentar sua adesão na tentativa de sobreviver e colonizar o hospedeiro.

### 5.3 VIAS METABÓLICAS EM *P. brasiliensis*

A partir dos diagramas de Venn e das listas de descritores geradas pelo programa VennMaster, foi possível analisar os genes modulados em diferentes situações de estresse e as diferentes respostas de um gene aos agentes utilizados. Esta análise apontou os caminhos da resposta global do fungo por meio de algumas vias metabólicas que serão discutidas adiante.

#### 5.3.1 METABOLISMO DE CARBOIDRATOS

Na figura 67 é possível observar a via glicolítica, gliconeogênese, fermentação alcoólica, o ciclo do ácido cítrico e a via pentose fosfato. Várias enzimas destas vias podem ser encontradas como moduladas em resposta aos agentes oxidantes e as que aparecem com modulação estatisticamente significativa são identificadas na figura pelo número de acesso (MAC ou MAS). Dentre estas, na glicólise, é possível citar a frutose 1,6 bifosfato aldolase (MAC0101 – descrita apenas como aldolase nas Figuras 27 e 39) responsável pela produção de gliceraldeído 3-fosfato a partir de frutose 1,6 bifosfato (STRYER, 1992; KEGG, 2008). Esta enzima aparece superexpressa em resposta a Paraquat<sup>®</sup> e sub-regulada em resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Testes com o gene desta enzima em plantas mostraram aumento na sua expressão em resposta ao estresse oxidativo causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (PUREV *et al.*, 2008). Estudos em córtex cerebral mostram que frutose 1,6 bifosfato aldolase e fosfoglicerato quinase são alvos de oxidação em doenças neurodegenerativas (MARTINEZ *et al.*, 2008).



**Figura 67:** Representação das vias de glicólise, gliconeogênese, pentose-fosfato, fermentação alcoólica e ciclo do ácido cítrico. Os genes das enzimas identificadas pelo número de acesso (MAC ou MAS) têm modulação estatisticamente significativa em resposta a pelo menos um dos agentes utilizados. As setas vermelhas mostram a superexpressão do gene em resposta a Paraquat®. Os genes das enzimas com setas verdes estão subregulados em resposta a Paraquat®. Os genes das enzimas com setas incolores não têm modulação estatisticamente significativa em resposta a este agente.

Outra etapa da via glicolítica é conduzida pela enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (G3PDH) (MAC0263 e MAC0128), que está relacionada à produção de 1,3-bifosfoglicerato a partir de gliceraldeído 3-fosfato e, indiretamente, ao estresse oxidativo por reciclar o  $\text{NAD}^+$  a NADH que poderá ser novamente utilizado em reações de óxido-redução (STRYER, 1992; KEGG, 2008). No entanto, como visto nas figuras 15, 36, 41, 48, 55 e 64, o gene desta enzima está com sua expressão diminuída em resposta a todos os agentes oxidantes, com exceção a 5 mM de Paraquat®, onde apresenta um leve aumento de pouco mais que 2 vezes na sua expressão. Este comportamento como resposta à  $\text{H}_2\text{O}_2$  já foi descrito na literatura em relação ao estresse oxidativo causado por arsenito (LAU, HE e CHIU, 2004). Baldeck e Marquis (2008) mostraram evidências da inibição da glicólise, principalmente da G3PDH em *Streptococcus mutans* tratado com  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Em *Aspergillus niger* também foi demonstrada a diminuição da atividade desta enzima associada à diminuição do consumo de glicose após o tratamento das culturas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  (LI *et al.*, 2008). Em *Saccharomyces cerevisiae* tratado com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a análise comparativa em gel de eletroforese bidimensional de proteínas totais mostrou a diminuição na expressão do gene de G3PDH (GODON *et al.*, 1998). Ralser e colaboradores (2007) mostraram a inibição da G3PDH em *Saccharomyces cerevisiae* e *Caenorhabditis elegans* tratados com  $\text{H}_2\text{O}_2$  e diamida. Estes dados confirmam os obtidos para *P. brasiliensis* tratado com peróxido de hidrogênio e GSNO. O aumento na expressão do gene em resposta a 5 mM de Paraquat® pode servir para reposição de NADH e continuação da glicólise. São encontrados estudos com eritrócitos humanos mostrando que em situações de estresse oxidativo, utilizando agentes oxidantes como derivados azólicos, N-etilmaleimida ou t-butil hydroperóxido, existe uma translocação da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase com diminuição de sua porção ligada à membrana e aumento da sua concentração citoplasmática levando a um aumento do fluxo da glicólise com reposição de NADH citoplasmático como forma de combate ao estresse (MALLOZZI, DI STASI e MINETTI, 1995; SIROVER, 1997; DIOUDIS *et al.*, 2008).

A próxima enzima da glicólise que aparece modulada nos experimentos é a piruvato quinase (MAC0313 – Figura 38) que leva à produção de piruvato a partir de fosfoenolpiruvato e à síntese concomitante de ATP. A partir do piruvato, é possível seguir a fermentação alcoólica com a formação de acetaldeído pela enzima piruvato descarboxilase (MAS0325 – Figura 38) (STRYER, 1992; KEGG, 2008). Os genes das duas enzimas apresentam o mesmo padrão de expressão verificado com os genes apresentados anteriormente, ou seja, sub-regulação em resposta à  $\text{H}_2\text{O}_2$  e superexpressão em resposta à Paraquat®. O acetaldeído pode então ser convertido em etanol pela enzima álcool

desidrogenase (MAC0060 e MAC1062) ou aldeído redutase (MAS2534 – Figura 53), com a oxidação de um NADH a NAD<sup>+</sup> (STRYER, 1992; KEGG, 2008). O gene de aldeído redutase (MAS2534) aparece superexpresso em resposta a Paraquat<sup>®</sup> e sub-regulado em resposta a GSNO. Os genes de álcool desidrogenase não apresentaram modulação estatisticamente significativa em resposta a nenhum agente oxidante utilizado, mas analisando as réplicas pode-se perceber que sua expressão está aumentada em resposta a todos os experimentos com Paraquat<sup>®</sup> e sub-regulada em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSNO. Em trabalho realizado por Godon e colaboradores (1998) foi demonstrado que o tratamento de *Saccharomyces cerevisiae* com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoca a diminuição na expressão de várias enzimas da via glicolítica, entre elas gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (já citada anteriormente), piruvato descarboxilase, piruvato desidrogenase e álcool desidrogenase.

Estes resultados são totalmente compatíveis com os obtidos para *P. brasiliensis* e levam à sugestão de que a glicólise esteja inibida em situações de estresse oxidativo causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, redirecionando o fluxo metabólico para a via pentose fosfato com produção de NADPH, importante no estresse oxidativo como co-enzima para glutatona redutase e tioredoxina redutase (GODON *et al.*, 1998; SHENTON e GRANT, 2003; RALSER *et al.*, 2007). Já em relação a 5 mM de Paraquat<sup>®</sup> as respostas são inversas, sugerindo que a glicólise e fermentação alcoólica estejam ativadas, apesar de genes da via pentose fosfato também estarem superexpressos em resposta a este agente, como será discutido posteriormente. Mallozzi, Di Stasi e Minetti (1995) sugerem que o aumento no fluxo glicolítico pode fornecer NADH (forma reduzida) e energia para as células combaterem o estresse oxidativo.

A enzima fosfo-enolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) (MAC0140 e MAC0423 – Figura 24) é capaz de fazer a interconversão entre oxalacetato e fosfo-enolpiruvato, notadamente utilizada na gliconeogênese para contornar a etapa glicolítica irreversível de formação do piruvato a partir de fosfo-enolpiruvato pela enzima piruvato quinase. O gene desta enzima é modulado com significância estatística apenas em resposta a Paraquat<sup>®</sup>, mostrando-se superexpresso, o que pode sugerir a ativação da gliconeogênese e não da glicólise em resposta à Paraquat<sup>®</sup>, uma vez que os genes superexpressos das outras enzimas da glicólise, citados acima, são comuns à gliconeogênese. Um estudo com cultura de células hepáticas (H4IIE) mostrou aumento na expressão de PEPCK induzido por butionina sulfoxamina (BSO), um gerador de estresse oxidativo por inibição da síntese de glutatona (ITO *et al.*, 2006). Teimouri e colaboradores (2006) também mostraram o aumento desta enzima em homogenatos de fígado de ratos após a indução de estresse oxidativo por administração de diazinon através de sonda gástrica. Foi demonstrado em plantas que radicais

livres gerados por ozônio foram capazes de aumentar a expressão de PEPCK (BORLAND *et al.*, 2006). O tratamento de ratos com injeções de Paraquat<sup>®</sup> induziu o aumento na expressão deste gene nos rins dos animais (TOMITA *et al.*, 2006). Recentemente, Derengowski e colaboradores (2008) mostraram, utilizando RT-PCR, o aumento na expressão do gene de PEPCK em *P. brasiliensis* recuperado após internalização por macrófagos murinos. Todos estes resultados corroboram com os dados apresentados para *P. brasiliensis* submetido a 5 mM de Paraquat<sup>®</sup>.

No ciclo do ácido cítrico, a síntese de citrato a partir de oxalacetato e acetil-CoA é feita pela enzima citrato sintase (MAC0002 – Figura 44) e a expressão do gene desta enzima aparece aumentada, entre 4,8 e 7 vezes, em resposta a GSNO e 1,6 vezes em resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em resposta a Paraquat<sup>®</sup> sua expressão não foi estatisticamente significativa, embora a análise pontual das réplicas experimentais tenha mostrado aumento na sua expressão variando entre 1,1 e 2,4 vezes. O aumento da expressão deste gene já foi observado em *zebrafish* (*Danio rerio*) quando cobre foi adicionado à água para induzir a produção de radicais hidroxil, através da reação de Fenton (CRAIG, WOOD e McCLELLAND, 2007).

A enzima aconitase (MAS0459 – Figura 28) responsável pela conversão de citrato à isocitrato também aparece com modulação positiva em resposta a 5 mM de Paraquat<sup>®</sup>, com aumento de 3,4 vezes, assim como os genes de isocitrato desidrogenase (MAS0557 – com aumento de 1,4 vezes e MAS1472 – com aumento de 1,5 vezes), enzima responsável pela oxidação de isocitrato à  $\alpha$ -cetoglutarato acoplada à redução de NAD<sup>+</sup> a NADH ou NADP<sup>+</sup> a NADPH (STRYER, 1992; KEGG, 2008). Em resposta a GSNO, nenhum destes genes (MAS0459, MAS0557 e MAS1472) tem modulação estatisticamente significativa. Em resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apenas o gene da aconitase apresenta modulação estatisticamente significativa, mostrando-se com a expressão diminuída de 1,5 a 2,2 vezes. A aconitase é uma enzima que contém Fe-S e está presente no regulon SoxRS em *E. coli*, um grupo coordenado de genes que são ativados em qualquer situação que aumente a produção de superóxidos nesta bactéria; fazem parte deste grupo, além da aconitase, a Mn-SOD, glicose 6-fosfato desidrogenase (ativada para aumentar a produção de NADPH), uma enzima de reparo de DNA, entre outras (FRIDOVICH, 1997). No entanto, como alvo de oxidação, a aconitase pode ser inativada por radicais livres, liberando ferro, que pode aumentar a situação de estresse oxidativo através da reação de Fenton (BOUTON, 1999; FARISS *et al.*, 2005). O estresse nitroso causado por sódio nitroprussiato em *Saccharomyces cerevisiae* levou à ativação de superóxido dismutase e catalase, mas causou inibição da aconitase (LUSHCHAK e LUSHCHAK, 2008). Batinic-Haberle e Benov (2008) demonstraram que, em *E. coli*



deficiente em SOD e ratos diabéticos, a isocitrato desidrogenase dependente de  $\text{NADP}^+$  é oxidada por radicais superóxidos, perdendo sua função. No entanto, a enzima inativada é repostada em nova síntese protéica, ou seja, quando tratados com superóxidos, os modelos aumentam a expressão de isocitrato desidrogenase. Jo e colaboradores (2001) mostraram o aumento da expressão da isocitrato desidrogenase dependente de  $\text{NADP}^+$  como resposta a EROs em células de fibroblastos de camundongos e propõem que esta enzima seja a maior produtora de NADPH, necessário para a regeneração de glutatona na mitocôndria, e por este motivo desempenha um papel fundamental na defesa da célula contra o estresse oxidativo.

Ainda no ciclo do ácido cítrico, o succinato pode ser convertido a fumarato pela succinato desidrogenase (MAC0332). Esta enzima é parte integrante da membrana interna da mitocôndria, participando diretamente da cadeia transportadora de elétrons, ao usar como acceptor destes elétrons o FAD que está ligado covalentemente à cadeia lateral de uma de suas histidinas. Após a ligação destes elétrons aos grupamentos de ferro-enzofre do FAD, este fica reduzido a  $\text{FADH}_2$ , seus elétrons podem ser transferidos diretamente para a ubiquinona ou radicais superóxido (STRYER, 1992; KEGG, 2008). O gene desta enzima também aparece superexpresso em resposta a Paraquat<sup>®</sup>, com aumento de 1,3 a 2,7 vezes, e sem modulação estatisticamente significativa em resposta aos outros dois agentes. Rosenstock e colaboradores (2009) testaram um inibidor da succinato desidrogenase em camundongos e observaram um aumento no estresse oxidativo e mudanças anatômicas associadas à patofisiologia da doença de Huntington. De uma forma geral, enzimas ligadas à fosforilação oxidativa, como a succinato desidrogenase, têm sido apontadas como grandes geradoras de EROs e suas atividades reduzidas em situações de estresse oxidativo evitando a formação de mais radicais livres (SLANE *et al.*, 2006; MAILLOUX *et al.*, 2007; VENKATRAMAN *et al.*, 2008). Assim, o comportamento desta enzima como resposta a Paraquat<sup>®</sup> não é o encontrado comumente na literatura. Mais à frente, o metabolismo energético será discutido com mais detalhes (item 5.4).

Fechando o ciclo do ácido cítrico, é possível observar a enzima malato desidrogenase (MAC1147 – Figura 48, MAC1414 – Figura 16 e MAS0724 – Figura 24), responsável pela interconversão de malato e oxalacetato. No sentido de formação de oxalacetato (oxidação) a reação está acoplada à redução de  $\text{NAD}^+$  a NADH (STRYER, 1992; KEGG, 2008). Os genes de malato desidrogenase aparecem sub-regulados em resposta a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , com diminuição na expressão de 2,2 a 4,2 vezes, e GSNO, com diminuição de 1,2 a 3,9 vezes. Em resposta a Paraquat<sup>®</sup> a expressão deste gene está aumentada em pouco mais que 2 vezes. Este perfil de resposta a  $\text{H}_2\text{O}_2$  é descrito por Godon e colaboradores (1998), que trataram *Saccharomyces*

*cerevisiae* com este agente oxidante. Venkatraman e colaboradores (2008) demonstraram inibição da malato desidrogenase em camundongos como resposta a benzo[ $\alpha$ ]pireno, um agente carcinogênico, por formar radicais livres com marcada lipoperoxidação. Arulkumaran e colaboradores (2007) também mostraram a inibição da malato desidrogenase e outras enzimas mitocondriais em ratas tratadas com um indutor de carcinoma mamário, que exerce seu efeito através da peroxidação. Novamente, a superexpressão desta enzima em resposta a Paraquat<sup>®</sup> não é um resultado encontrado na literatura. Ao contrário, é demonstrada por Fukushima e colaboradores (1993), a diminuição da atividade das enzimas mitocondriais, como a malato desidrogenase, em resposta a Paraquat<sup>®</sup>. No entanto, a produção de espécies reduzidas (NADH) e a sua ação no ciclo do glioxilato podem ser explicações para o aumento na expressão deste gene.

Um trabalho com camundongos *Swiss* albinos mostrou que o tratamento destes animais com injeções intraperitoniais de benzo[ $\alpha$ ]pireno provocou a diminuição nos níveis das enzimas isocitrato,  $\alpha$ -cetoglutarato, succinato e malato desidrogenases (VENKATRAMAN *et al.*, 2008). Bactérias *P. fluorescens* mostraram forte inibição de  $\alpha$ -cetoglutarato, NAD-isocitrato e succinato desidrogenases quando tratadas com menadiona (gerador de superóxidos) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MAILLOUX *et al.*, 2007). Godon e colaboradores (1998) também mostram inibição de algumas enzimas do ciclo do ácido cítrico em *Saccharomyces cerevisiae* tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *E. coli* SOD deficiente tratada com dióxido de titânio fotoexcitado, capaz de gerar estresse oxidativo, apresentou diminuição na expressão de todas as enzimas do ciclo do ácido cítrico (OJIMA, NISHIOKA e TAYA, 2008). Estes dados são congruentes com os apresentados em *P. brasiliensis* como resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSNO, confirmando os dados aqui apresentados e sugerindo que este fungo diminui a atividade do ciclo do ácido cítrico em resposta a estes agentes. No entanto, quando tratado com 5 mM de Paraquat<sup>®</sup>, o fungo apresenta um comportamento diferente, aumentando a expressão destas enzimas, levando à consideração de que aumenta a atividade deste ciclo para gerar mais espécies reduzidas, como NADH e NADPH, importantes no combate ao estresse. Este comportamento também pode ser visto em vários trabalhos com estresse oxidativo já citados anteriormente (FRIDOVICH, 1997; JO *et al.*, 2001; CRAIG, WOOD e McCLELLAND, 2007; BATINIC-HABERLE e BENOVA, 2008); o que mostra a utilização desta via pelo fungo de maneiras diferentes em situações de estresse e uma relação ainda intrincada entre o ciclo do ácido cítrico e EROs e ERNs.

Em uma ramificação do ciclo do ácido cítrico, o succinato pode ser formado a partir de succinato semialdeído por uma enzima conhecida como succinato semialdeído desidrogenase

(SSADH) (KEGG, 2008) (MAS1067 – Figura 46), que aparece superexpressa em resposta a GSNO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mas não teve resultado estatisticamente significativo em resposta a Paraquat<sup>®</sup>. Alguns trabalhos recentes mostram que a inativação do gene de SSADH leva à produção de EROs (GUPTA *et al.*, 2003; LATINI *et al.*, 2007; LUDEWIG *et al.*, 2008). Coleman e colaboradores (2001) demonstraram a ativação do gene de SSADH e da via metabólica do glutamato por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *Saccharomyces cerevisiae* como uma forma de equilibrar mudanças de oxidação-redução nas células. Estes dados confirmam os resultados obtidos para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSNO em *P. brasiliensis*.

Na via pentose fosfato, aparecem os genes das enzimas glicose 6-fosfato isomerase ou desidrogenase (G6PDH) (MAS0089 – Figura não mostrada), que transforma glicose 6-fosfato em 6-fosfogluconato e 6-fosfogluconato desidrogenase (MAC0706 – Figura 30, MAC1328 e MAS0569 – Figuras não mostradas) que converte o 6-fosfogluconato em ribulose 5-fosfato. As duas reações são acopladas à redução de NADP<sup>+</sup> a NADPH. Na etapa seguinte a ribose 5-fosfato isomerase (MAS0236) converte a ribulose 5-fosfato em ribose 5-fosfato e esta pode ser transformada em frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato por meio da ação das enzimas fosfopentose epimerase (possivelmente MAS0567 – Figura 13), transcetolase e transaldolase (STRYER, 1992; KEGG, 2008). O gene de G6PDH aparece superexpresso em resposta a Paraquat<sup>®</sup> e não tem modulação estatisticamente significativa em resposta à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSNO. Os genes da 6-fosfogluconato desidrogenase aparecem superexpressos em resposta a 5 mM e subregulados em resposta a 0,5 mM de Paraquat<sup>®</sup>, ao contrário do gene de ribose 5-fosfato isomerase. Nenhum deles tem modulação estatisticamente significativa em resposta a GSNO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Já o gene de epimerase, aparece superexpresso em resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a 0,5 mM de Paraquat<sup>®</sup> sem ter modulação estatisticamente significativa a GSNO. Fora da via, o mesmo acontece com o gene de desoxirribose fosfato aldolase (MAS0983), responsável pela conversão de desoxirribose fosfato em acetaldeído e gliceraldeído 3-fosfato. Em resposta ao estresse oxidativo os fungos podem redirecionar o seu fluxo metabólico da glicólise para a via pentose fosfato, principal rota de produção de NADPH para manutenção do balanço oxidativo e a G6PDH é a enzima limitante e porta de entrada nesta via (KLETZIEN, HARRIS e FOELLM, 1994; GRANT, 2008). O gene de G6PDH foi mostrado com sua expressão aumentada em *E. coli* tratada com Paraquat<sup>®</sup> e menadiona (GREENBERG *et al.*, 1990). Em *E. coli* também, foi clonado este gene de *Trypanosoma cruzi*, respondendo com aumento de expressão em resposta ao estresse oxidativo (IGOILLO-ESTEVE e CAZZULO, 2006). Godon e colaboradores (1998) mostraram o aumento na produção desta enzima, tratando *Saccharomyces cerevisiae* com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Izawa e colaboradores (1998) mostraram que mutantes

deste mesmo fungo com o gene de G6PDH deletado são mais sensíveis ao estresse oxidativo gerado por  $H_2O_2$ . Utilizando microarranjos de DNA, Wang e colaboradores (2006) mostraram o aumento na expressão deste gene em *Candida albicans* tratada com  $H_2O_2$ . Estes dados confirmam a importância da via pentose fosfato para a defesa de *P. brasiliensis* contra o ataque oxidativo, gerado principalmente por Paraquat<sup>®</sup>.

### 5.3.2 METABOLISMO ENERGÉTICO

A fosforilação oxidativa (Figura 68) é composta por três complexos enzimáticos que bombeiam prótons, ligados por dois transportadores móveis de elétrons, um complexo enzimático ligado ao ciclo do ácido cítrico (fumarato redutase ou succinato desidrogenase – complexo II) e um complexo com um canal para o retorno de prótons e produção de ATP (FoF<sub>1</sub>ATP sintase – complexo V). O primeiro complexo, que bombeia prótons para fora da membrana interna da mitocôndria, é conhecido como NADH-Q redutase ou NADH desidrogenase (complexo I). Os dois elétrons do NADH são transferidos para flavina mononucleotídeo (FMN), o grupamento prostético deste complexo, que é reduzido a FMNH<sub>2</sub>. Posteriormente, estes elétrons serão transferidos do FMNH<sub>2</sub> para aglomerados ferro-enxofre (Fe-S), o segundo grupamento prostético da NADH-Q redutase, que são responsáveis por transferi-los então para a ubiquinona ou coenzima Q, o primeiro elemento móvel da cadeia. Ao mesmo tempo prótons são bombeados para o espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria conhecido como espaço intermembranas ou tilacóide (STRYER, 1992; KEGG, 2008).

A succinato desidrogenase, enzima que faz parte do complexo II, converte o succinato em fumarato e transfere elétrons para o FAD que está ligado covalentemente à cadeia lateral de uma de suas histidinas. Após a ligação destes elétrons aos grupamentos de ferro-enxofre do FAD este fica reduzido a FADH<sub>2</sub>. A ubiquinona também é responsável por receber os elétrons do FADH<sub>2</sub> convertendo-se à sua forma reduzida o ubiquinol ou QH<sub>2</sub>, que transfere os elétrons recebidos para o citocromo c utilizando o terceiro complexo enzimático, o citocromo c redutase ou ubiquinol citocromo c redutase (complexo III). Esta transferência ocorre por meio de um intermediário semiquinônico (QH<sup>•</sup>). Primeiramente um elétron é transferido para um aglomerado Fe-S deste complexo, segue para o segundo grupamento, o citocromo c<sub>1</sub> e então para o citocromo c, o segundo elemento móvel da cadeia, que o leva para fora do complexo. Isto leva a redução de QH<sub>2</sub> para QH<sup>•</sup>. Esta semiquinona é então reduzida a ubiquinona pelo citocromo b566, que reduz o citocromo b562. Por sua vez, o citocromo b562 vai reduzir QH<sup>•</sup>.

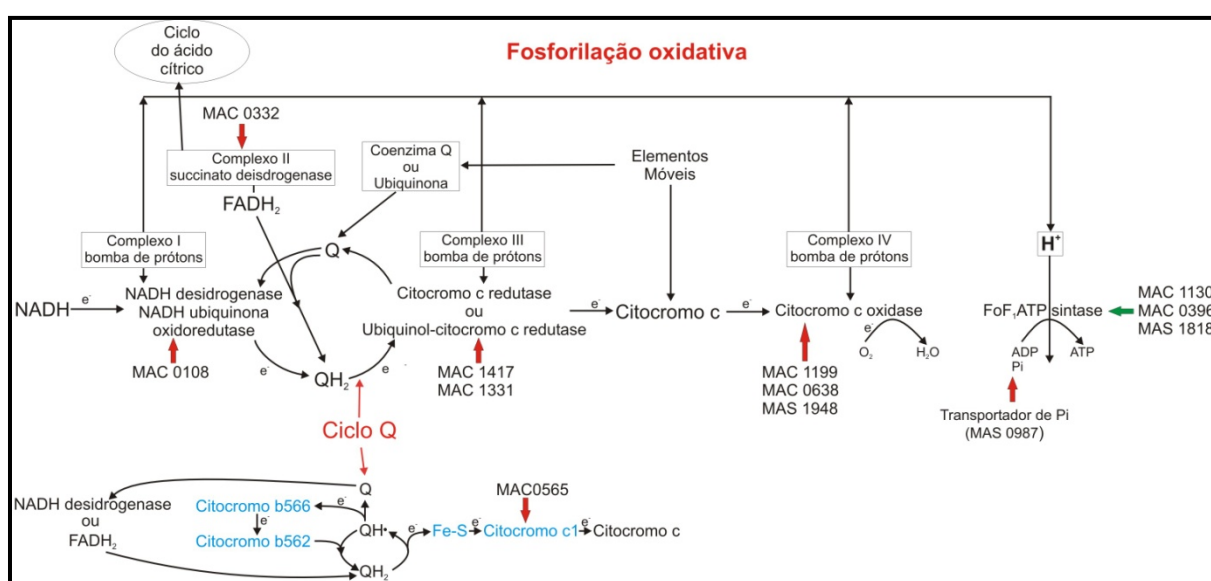
a QH<sub>2</sub> e este inicia novamente o processo de transferência para o aglomerado Fe-S. O funcionamento deste complexo faz com que novamente prótons sejam jogados para o espaço tilacóide. Este processo de transferência dos elétrons do complexo I e II para o complexo III é conhecido como ciclo Q (STRYER, 1992).

O quarto complexo enzimático, que também bombeia prótons, é chamado de citocromo c oxidase (complexo IV). Neste, os elétrons do citocromo c são transferidos para o oxigênio, reduzindo-o à água, por meio de pelo menos 8 subunidades (algumas codificadas pelo genoma mitocondrial), entre elas grupos hemo, citocromos (a e a<sub>3</sub>) e íons cobre (STRYER, 1992).

O resultado destas transferências de elétrons e o bombeamento de prótons (H<sup>+</sup>) para o exterior da matriz mitocondrial é a criação de um gradiente eletro-químico. Este gradiente serve como força motriz para a produção de ATP, quando estes prótons, retornando à matriz mitocondrial através do complexo enzimático V conhecido com FoF<sub>1</sub>ATP sintase, liberam energia para a conversão de ADP e um grupamento fosfato, em ATP neste mesmo complexo (STRYER, 1992).

Nos resultados apresentados aparecem alguns genes dos complexos enzimáticos ligados à fosforilação oxidativa, são eles: ubiquinol citocromo c redutase (MAC1417 – Figuras 16, 28 e 38), citocromo c redutase subunidade Fe-S (MAC1331 – Figura 38), precursor do citocromo c1 (MAC0565 – Figuras 27 e 38), citocromo c oxidase (MAC1199 – Figuras 17, 27 e 37), citocromo c oxidase – subunidade V (MAS1948 – Figuras 29 e 41), citocromo c oxidase – subunidade VI (MAC0638 – Figura 38) e transportador de fosfato inorgânico (MAS0987 – Figura 27). Todos estes genes aparecem superexpressos ao tratamento com Paraquat<sup>®</sup> e sub-regulados ou sem modulação estatisticamente significativa a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSNO. Também pode ser visto o gene de FoF<sub>1</sub>ATP sintase (MAC1130 – Figura 16), que aparece subregulado ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e não tem modulação estatisticamente significativa a Paraquat<sup>®</sup> e GSNO, cadeia alfa ATP sintase (MAS1818 – Figuras 48 e 55), que aparece sub-regulado em resposta aos três agentes e subunidade beta ATP sintase (MAC0396 – Figura 36), que aparece sub-regulado a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Paraquat<sup>®</sup>, mas não tem modulação estatisticamente significativa a GSNO. Nestes dois últimos genes a expressão em resposta a Paraquat<sup>®</sup> 5 mM retorna ao nível basal. A subregulação dos genes destas enzimas ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSNO é explicada na literatura por inúmeros indícios de que a cadeia respiratória seja a maior fonte geradora de superóxidos e radicais livres nas células, assim a diminuição da sua atividade minimizaria a principal fonte endógena de radicais livres (IUCHI e WEINER, 1996; SIES, 1997; FINKEL e HOLBROOK, 2000; FÖRSTERMANN, 2008;

OJIMA, NISHIOKA e TAYA, 2008). Em relação ao aumento na expressão destes genes em resposta a Paraquat<sup>®</sup>, não existem indícios deste tipo de comportamento, o que leva à suposição de que este aumento seja no sentido de repor as proteínas e enzimas que foram oxidadas pelo Paraquat<sup>®</sup>, principalmente por terem subunidades com metais como Fe, Cu e S (FLINT, TUMINELLO e EMPTAGE, 1993; GORT e IMLAY, 1998), uma vez que o mau funcionamento da fosforilação oxidativa levaria a uma produção ainda maior destes radicais (WEI e LEE, 2002; CALABRESE *et al.*, 2005; IMLAY, 2006; VENKATRAMAN *et al.*, 2008).

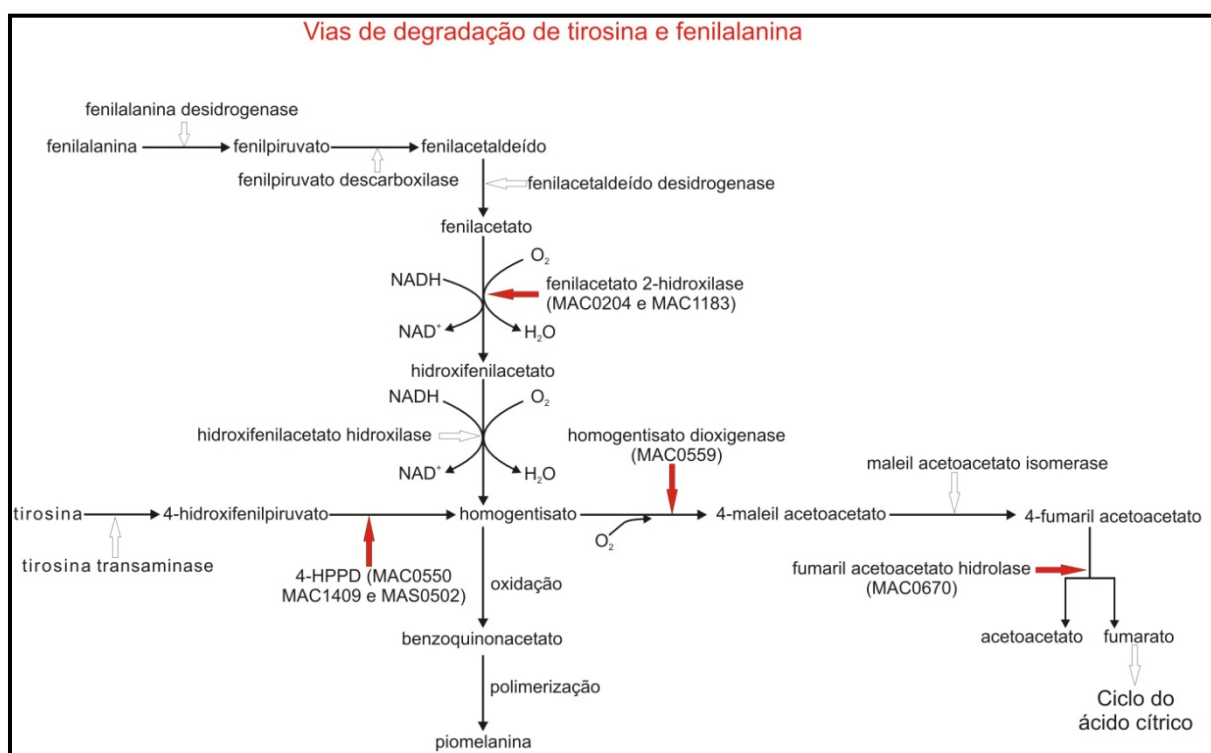


**Figura 68:** Fosforilação oxidativa. As proteínas e subunidades de enzimas identificadas com o número de acesso (MAC ou MAS) tem modulação estatisticamente significativa em resposta a pelo menos um dos agentes oxidantes utilizados. As setas vermelhas indicam superexpressão em resposta a Paraquat<sup>®</sup>, a seta verde indica sub-regulação em resposta aos três agentes oxidantes. Em letras azuis, algumas subunidades do complexo enzimático ubiquinol-citocromo c redutase.

### 5.3.3 METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS

Nas figuras 15, 16, 28 e 38 encontra-se um gene denominado 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (4HPPD – MAC0550, MAC1409 e MAS0502). Análises funcionais mostraram que este gene é responsável pela enzima 4HPPD do fungo, envolvida com a degradação dos aminoácidos tirosina e fenilalanina (Figura 69) (WYCKOFF *et al.*, 1995). Sabe-se que a atividade da 4HPPD leva à produção de ácido homogentísico ou homogentisato (KAVANA e MORAN, 2003), substância que possui o potencial de atuar como bloqueador de ataques oxidativos, notadamente, por meio de mediadores liberados por macrófagos de hospedeiros infectados e cuja ação, parece ser decisiva para garantir o sucesso da resposta à infecção por *P. brasiliensis* (GONZALES *et al.*, 2000; HALL *et al.*, 2001; BORGES-WALMSLEY *et al.*,

2002). Este bloqueio ocorre, pois o homogentisato na presença de  $O_2$ , ou outro agente oxidante doador de oxigênio, é convertido a 4-maleilacetoacetato pela enzima homogentisato dioxigenase (MAC0559 – Figura 38) que é então convertido a 4-fumaril acetoacetato e hidrolisado a acetoacetato e fumarato pela fumaril acetoacetato hidrolase (MAC0670 – Figura 37) (KEGG, 2008). Nossos resultados são compatíveis com estas informações, uma vez que estes genes (MAC0550, MAS0502, MAC0559 e MAC0670) aparecem com suas expressões aumentadas em resposta ao estresse oxidativo gerado por 5 mM de Paraquat<sup>®</sup>.



**Figura 69:** Metabolismo da tirosina e fenilacetato. Os genes identificados com o número de acesso MAC ou MAS têm modulação estatisticamente significativa em resposta a Paraquat<sup>®</sup>. As setas vermelhas indicam a superexpressão dos genes em resposta a Paraquat<sup>®</sup>. (Fonte: Adaptado de SCHMALER-RIPCKE *et al.*, 2009.)

Schmalер-Ripcke e colaboradores (2009) mostraram que o gene de 4HPPD e o homogentisato, envolvidos na degradação de tirosina, são fatores fundamentais na produção de piomelanina, um tipo secundário de melanina produzido a partir da polimerização de benzoquinonacetato, obtido da oxidação de homogentisato (Figura 69). A produção deste pigmento, portanto, se dá por uma via independente de diidroxifenilalanina (DOPA) e laccases. Estes pesquisadores produziram um mutante de *Aspergillus fumigatus* com o gene de 4HPPD deletado e outro com o gene de homogentisato dioxigenase deletado, mostrando no primeiro a falta de pigmentação e maior sensibilidade ao estresse oxidativo provocado por  $H_2O_2$  e diamida; no segundo, verificaram o acúmulo de homogentisato e aumento na

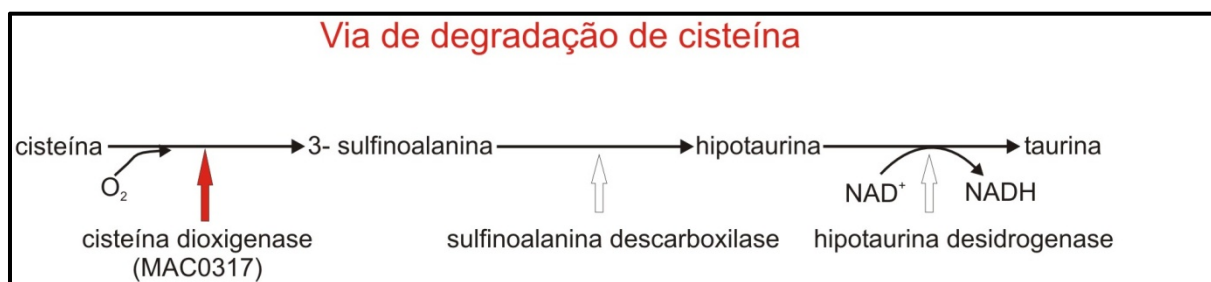
pigmentação com maior produção de piomelanina, no entanto, a resistência ao estresse oxidativo foi equivalente ao fungo selvagem. Um experimento com a bactéria patogênica *Burkholderia cenocepacia* mostrou que esta é capaz de produzir piomelanina e mutantes com o gene de 4HPPD deletado, além de não produzirem o pigmento, são mais sensíveis ao estresse oxidativo gerado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e superóxidos produzidos por um sistema de xantina oxidase; em resposta a Paraquat<sup>®</sup> o mutante foi tão resistente quanto o selvagem, no entanto, isto pode ser explicado pelo fato de que a piomelanina produzida por esta bactéria é exportada e fica no sobrenadante da cultura e o Paraquat<sup>®</sup> gera radicais superóxidos apenas no espaço intracelular (KEITH *et al.*, 2007). Estes trabalhos confirmam a importância do gene de 4HPPD na resistência dos microrganismos ao estresse oxidativo e provavelmente na sua sobrevivência quando internalizados nos fagócitos.

Outro aspecto importante acerca do 4HPPD, diz respeito à existência de uma substância capaz de inibir sua atividade. Esta substância é o 2-(2-nitro-4-trimetilbenzoi)-1,3-ciclohexanodiona, também conhecido como NTBC ou Nitisinona (HALL *et al.* 2001; KAVANA e MORAN, 2003). O NTBC age como um inibidor competitivo específico da 4HPPD, e é o princípio ativo de um medicamento conhecido como Orfadin<sup>®</sup>, utilizado para tratamento de Tirosinemia do tipo I, uma doença genética associada a mutações que inativam o gene que codifica a fumarilacetoacetato hidrolase (LUIJERINK *et al.*, 2003). Com a inibição desta via evita-se o acúmulo de 4-fumaril acetoacetato (Figura 69). Experimentos realizados por Nunes e colaboradores (2005), descreveram um papel fundamental da enzima 4HPPD na transição micélio-levedura de *P. brasiliensis*. Foram feitos testes de transição do fungo na presença de concentrações crescentes de NTBC, verificando que a partir de concentrações de 100 µg/mL houve a inibição total da transição do *Paracoccidioides brasiliensis*. Esta via de degradação da tirosina merece atenção especial na luta contra a paracoccidioidomicose, e novos estudos devem ser realizados para entendermos melhor o real papel dos genes desta via para o *Paracoccidioides brasiliensis*.

A produção de homogentisato também pode ser feita a partir de fenilacetato em uma reação com duas etapas (Figura 69). Uma delas é realizada pela enzima fenilacetato 2-hidroxilase (MAC0204 – Figuras 25 e 50 e MAC1183 – Figura 50) que oxida o fenilacetato a hidroxifenilacetato, consumindo NADH e liberando NAD<sup>+</sup> em uma reação acoplada com a redução de O<sub>2</sub> ou superóxidos. A segunda etapa envolve a conversão de hidroxifenilacetato em homogentisato, também com o consumo de NADH (ou NADPH) e liberação de NAD<sup>+</sup> (ou NADP<sup>+</sup>) acoplado a redução de O<sub>2</sub> (MINGOT, PEÑALVA e FERNÁNDEZ-CAÑÓN, 1999). Os genes MAC0204 e MAC1183 aparecem superexpressos em resposta a Paraquat<sup>®</sup> e GSNO.



Em outra via de metabolismo de aminoácidos mostrada na figura 70, tem-se o gene da cisteína dioxigenase (MAC0317 – Figura 24), responsável pela oxidação de cisteína a 3-sulfinoalanina, esta, após descaboxilação, é convertida em hipotaurina pela sulfinoalanina descaboxilase. Por sua vez a hipotaurina é oxidada a taurina em uma reação acoplada com a redução de um  $\text{NAD}^+$  (ou  $\text{NADP}^+$ ) a  $\text{NADH}$  (ou  $\text{NADPH}$ ) (KEGG, 2008). O gene de cisteína dioxigenase (MAC0317) foi superexpresso em resposta a todas as concentrações de Paraquat® e GSNO.



**Figura 70:** Via de degradação de cisteína. O gene identificado com o número de acesso MAC0317 tem aumento estatisticamente significativo na sua expressão em resposta a Paraquat® e GSNO.

A taurina é um ácido orgânico derivado de cisteína presente na bÍlis, intestino e alguns outros tecidos de animais e seres humanos. Apesar de a taurina ser descrita como um aminoácido, na verdade o correto seria designá-la como um ácido amino-sulfônico, pois no lugar do grupo carboxila ela possui um grupo sulfoxila (BROSNAN e BROSNAN, 2006). Várias funções têm sido atribuídas à taurina como manutenção da homeostase de cálcio, osmorregulação, remoção do ácido hipocloroso, e estabilização de membranas (HUXTABLE, 1992; WRIGHT, TALLAN e LIN, 1986). Estudos demonstram que a taurina e seu precursor, a hipotaurina, possuem atividade antioxidante (COZZI *et al.* 1995; REDMOND, WANG e BOUCHIER-HAYES, 1996). A hipotaurina competiu com agentes antioxidantes como o dimetil pirroli-N-óxido (DMPO) por radicais hidroxil, e esta atividade deve-se ao seu grupamento sulfoxil, que atua como “scavenger” destes radicais (GREEN *et al.*, 1991). Outros estudos mostram também um efeito antioxidante indireto, prevenindo mudanças na permeabilidade da membrana durante ataques oxidativos (NAKASHIMA, TANIKO e KURIYAMA, 1982; GÜRER *et al.*, 2001). No entanto Aruoma e colaboradores (1988) e Shi e colaboradores (1997) mostraram que este efeito antioxidante deve ser atribuído a hipotaurina e não a taurina.

A administração profilática de taurina protege o pulmão de danos induzidos pela inalação de  $\text{NO}_2$  ou  $\text{O}_3$  e pela instilação intratraqueal de Paraquat®, todos estes modelos de

danos pulmonares envolvem um influxo de neutrófilos e macrófagos seguidos da produção de mediadores da inflamação (BARUA, LIU e QUINN, 2001).

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

Após a fagocitose, neutrófilos e monócitos, utilizando a enzima mieloperoxidase, geram ácido hipocloroso (HOCl). A taurina reage com o HOCl e forma a taurina cloramina. Vários estudos indicam que a taurina cloramina inibe a produção de NO, TNF- $\alpha$  e outros mediadores da inflamação (GAUT *et al.*, 2002; NAGL *et al.*, 2000; BARUA, LIU e QUINN, 2001; HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2000). Dentre estes estudos pode-se citar o realizado por Marcinkiewicz e colaboradores (1999) em que foi relatado que a produção de NO, por células dendríticas murinas contra organismos patogênicos, foi inibida por taurina cloramina de maneira dose dependente.

### 5.3.4 OUTROS GENES RELEVANTES

Um resultado surpreendente foi obtido com o gene da enzima cobre amino oxidase (MAS1168 – Figuras 13, 47, 52 e 63). Esta enzima pertence a uma classe responsável pela desaminação de aminas primárias e formação do respectivo álcool. O surpreendente é que esta reação libera amônio e peróxido de hidrogênio (KEGG, 2008), e mesmo durante a exposição do fungo a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSNO e 0,5 mM de Paraquat<sup>®</sup> este gene está superexpresso. Apenas em resposta a 5 mM de Paraquat<sup>®</sup> é que o gene está sub-regulado. Experimentos com *Saccharomyces cerevisiae* mostraram que a adição de farnesol isoprenoide exógeno, um precursor da biossíntese de esteróis e não esteróis isoprenóides, leva à diminuição no crescimento deste fungo por gerar EROs através da hiperpolarização do potencial transmembrana mitocondrial (MACHIDA e TANAKA, 1999). No entanto um análogo do farnesol, a farnesilamina, induz a formação de EROs de forma independente da alteração do potencial transmembrana mitocondrial. Segundo Tanaka e colaboradores (2004), o mecanismo de geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> passa pela ativação da cobre amino oxidase. O aumento da expressão da enzima cobre amino oxidase também foi relacionado, em plantas, com o aumento na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicando inclusive, grande relevância desta enzima na defesa contra patógenos (REA *et al.*, 2002).

De uma forma geral, é possível ver nas figuras alguns fatores de transcrição (por exemplo: MAS1853 e MAC0408 – fator de transcrição de cutinase – Figuras 13, 44, 60) e

proteínas ribossomais (por exemplo, MAS0570 e MAS2795 – Figura 17, entre outras) que ora aparecem superexpressos, ora sub-regulados. Estes genes não têm uma ligação específica com o estresse oxidativo ou nitroso, mas mostram a atividade celular com síntese de proteínas para adaptação do fungo ao meio onde está inserido. É possível ver também um gene de reparo de DNA (MAS0994 – Figura 27), que pode estar ativado para corrigir danos realizados nesta molécula pelos agentes oxidantes. Ele aparece superexpresso em resposta a Paraquat<sup>®</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

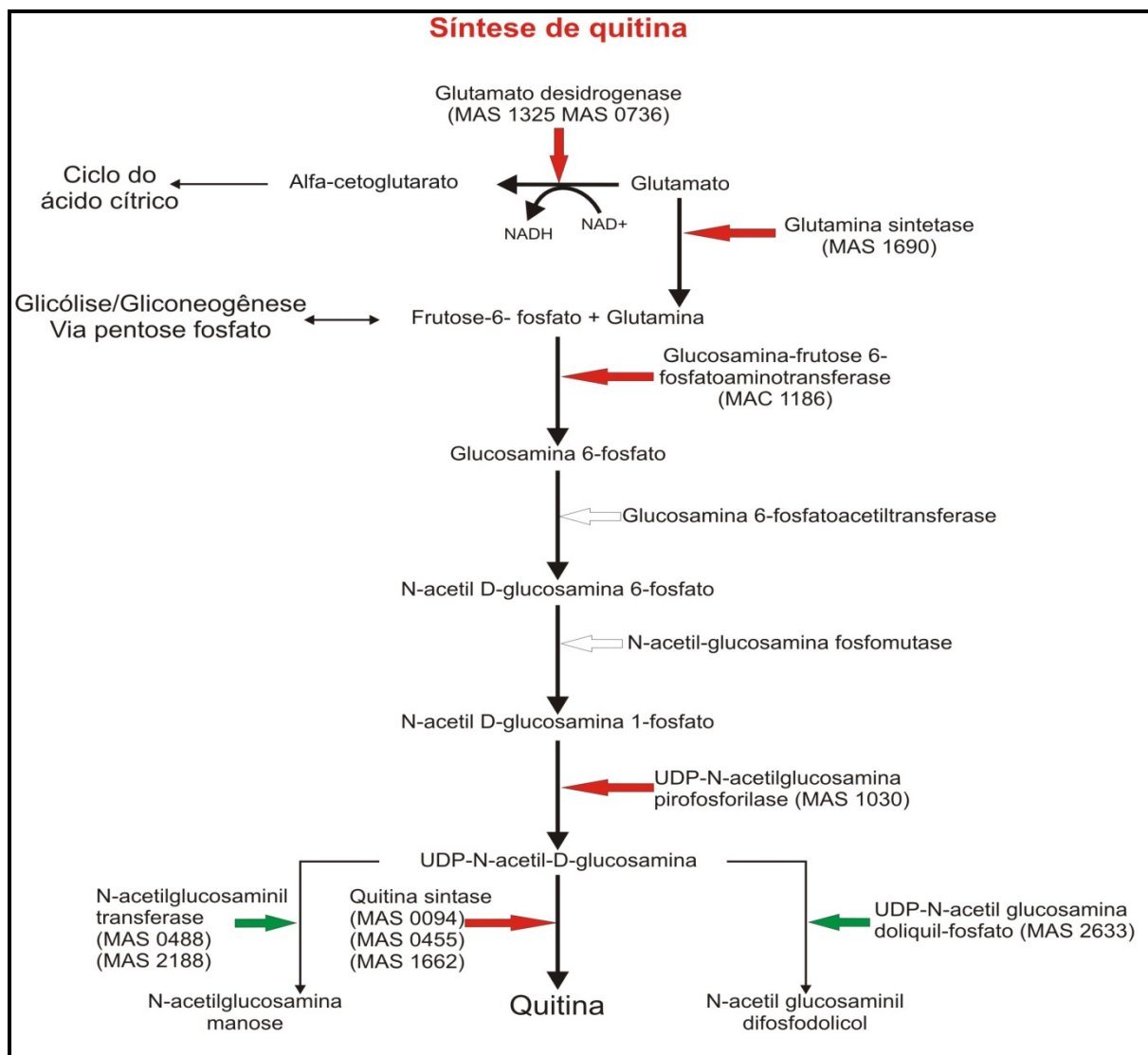
Observa-se nas figuras 15, 29, 39, 48, 54 e 61, que genes de biotina sintase (MAS1290 e MAS0706), enzima limitante no processo de produção de biotina, estão ativados devido à produção de superóxidos pelo Paraquat<sup>®</sup>, sugerindo que o fungo utilize um mecanismo de defesa ligado à biotina. Uma análise cuidadosa da literatura revelou um único trabalho que identifica a biotina como uma substância envolvida em resposta contra agentes oxidantes (SEKIGUCHI e NAGAMINE, 1994). Neste estudo, os autores sugerem que a biotina seria capaz de funcionar como um agente antioxidante indireto, ou seja, não atuando diretamente na detoxificação de radicais livres, mas por meio da modulação de enzimas da via da NADPH oxidase que catalisa a conversão de O<sub>2</sub> ou O<sub>2</sub><sup>•-</sup> em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>O e NADPH em NADP<sup>+</sup>. Foram identificadas pelo menos 4 enzimas carboxilases que são dependentes de biotina em mamíferos e 5 classes de histonas que tem ligação covalente com biotina (GRAVEL e NARANG, 2005). No entanto, não foi possível detectar o aumento na expressão destas carboxilases em nossos experimentos, pois as duas enzimas presentes no “chip” não apresentaram modulação estatisticamente significativa. O efeito da ausência de biotina foi comparado ao do causado por EROs gerados na cadeia respiratória em fibroblastos pulmonares humanos (DEPEINT *et al.*, 2006). A toxicidade mitocondrial resultante da inativação de carboxilases por ausência de biotina foi descrita por Rodríguez-Meléndez e colaboradores (2001).

Em relação à biotina sintase, existem estudos mostrando a presença de dois grupamentos Fe-S nesta enzima (LAYER *et al.*, 2004; JARRET, 2005). Estes grupos Fe-S podem conferir à enzima a capacidade de participar de reações de oxido-redução, como é o caso da formação da molécula de biotina (WANG e FREY, 2007).

O gene de glicosamina-frutose 6-fosfato aminotransferase (MAC1186 – Figura 25) e quatro genes de quitina sintase (MAS1662 – Figura 25, MAS0455 e MAS1341 – Figura 27 e MAS0094) também aparecem nesta relação com superexpressão em resposta exclusivamente a Paraquat<sup>®</sup>. A glicosamina-frutose 6-fosfato aminotransferase, ou glicosamina 6-fosfato sintase, catalisa a conversão de frutose 6-fosfato em glicosamina 6-fosfato, utilizando uma glutamina como doadora de nitrogênio. O produto final desta via metabólica é o UDP-N-

acetil glicosamina, a substância mais utilizada na síntese de quitina para a parede fúngica (MILEWSKI, 2002; WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2005). Observando todos os genes responsivos a este agente (não só os exclusivos) podem ser encontrados um gene de glutamina sintase (MAS1690) e de UDP-N-acetilglicosamina pirofosfatase (MAS1030) ambos superexpressos em resposta a Paraquat<sup>®</sup> e sub-regulados em resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSNO. Os genes de N-acetil glucosaminiltransferase (MAS0488 e MAS2188) e UDP-N-acetilglicosamina doliquil-fosfato ou UDP-N-acetilglicosamina fosfato (MAS2633) podem ser vistos sub-regulados em resposta a 5 mM de Paraquat<sup>®</sup>. Estes resultados apontam para o aumento na síntese de quitina, para fortalecer a parede fúngica contra o estresse causado por Paraquat<sup>®</sup>, como pode ser visto na figura 71, onde a via de síntese de quitina é apresentada a partir de frutose 6-fosfato e glutamina. As setas vermelhas indicam a superexpressão da enzima responsável por aquela etapa, enquanto as setas verdes indicam a sub-regulação da enzima catalizadora da reação apontada em resposta a Paraquat<sup>®</sup>.

A quitina, assim como a  $\alpha$ -1,3 glucana, já foi apontada por alguns autores como possível fator de virulência, mostrando cepas menos virulentas com a diminuição de quitina na composição de sua parede (COX e BEST, 1972; HOGAN, KLEIN e LEVITZ, 1996). Em *Candida albicans* a quitina também pode ser considerada um fator de virulência, pois cepas mutantes deficientes em quitina se mostraram menos virulentas em camundongos (BULAWA *et al.*, 1995). Osmond, Specht e Robbins (1999) demonstraram que a deleção do gene de quitina sintase III (CHSIII), maior produtor de quitina em *Saccharomyces cerevisiae*, leva a mutantes inviáveis deste fungo. A atividade antioxidante e antimutagênica de derivados da quitina como quitosana, sulfato de quitosana e carboximetil-quitina glucana foi comprovada em estudos *in vitro* que sugerem atividade “scavenger” destas substâncias contra radicais hidroxil e oxigênio singlete (SHON *et al.*, 2002; SLAMENOVA *et al.*, 2003; XING *et al.*, 2005; LAZAROVA *et al.*, 2006; MENDIS *et al.*, 2007; HORVATHOVA *et al.*, 2008). A quitosana solúvel em água também se mostrou efetiva no combate ao estresse oxidativo *in vivo*, quando adicionada como suplemento dietético (ANRAKU *et al.*, 2008). Nunes e colaboradores (2005) mostraram um aumento na expressão de várias quitino-sintases durante a transição dimórfica deste fungo. Bulik e colaboradores (2003) demonstraram que o aumento da deposição de quitina na parede e septo celulares de *Saccharomyces cerevisiae* está diretamente ligado ao aporte dos intermediários (glucosaminas e N-acetil glucosaminas) e a atividade das enzimas da via sintética.



**Figura 71:** Via de síntese de quitina a partir de frutose 6-fosfato e glutamina. As enzimas identificadas com o número de acesso (MAC ou MAS) tem modulação estatisticamente significativa em resposta a pelo menos um dos agentes oxidantes utilizados. As setas vermelhas indicam superexpressão e as verdes indicam sub-regulação em resposta a Paraquat®, do gene responsável pela enzima catalizadora da etapa indicada.

Recentemente foi demonstrado em *Cryptococcus neoformans* que a via metabólica ativada pela proteína quinase C1 (Pkc1) é essencial na manutenção da integridade celular, manifestação normal dos fatores de virulência e proteção contra o estresse oxidativo e nitroso. A manutenção da integridade celular realizada pela Pkc1 está ligada diretamente à quitina e quitosana, pois mutantes com o gene de Pkc1 deletado apesar de possuírem níveis semelhantes destas substâncias em relação ao fungo selvagem, apresentam erros na localização destas que tornam o fungo mais sensível ao estresse oxidativo e nitroso (GERIK *et al.*, 2008). Estes dados somados aos aqui apresentados indicam fortemente um possível alvo terapêutico, uma vez que o fungo parece se defender deste tipo de estresse aumentando a quantidade deste produto na composição de sua parede, evitando desta forma, a entrada de radicais na célula. Além disso, como a atividade antioxidante de derivados da quitina foi

comprovada nos experimentos citados anteriormente, é possível também, que o aumento na quantidade de quitina na parede do fungo proteja-o do ataque de radicais livres, por meio de uma atividade “scavenger” desta substância. Isto sugere uma grande relação com a capacidade comprovada deste fungo em permanecer “inerte” no organismo humano dentro de granulomas por vários anos, causando recidivas ou até mesmo o aparecimento da doença longo prazo após o contato com áreas endêmicas. Uma inibição desta via pode auxiliar nos tratamentos atuais diminuindo as chances de recidivas ou até mesmo encurtando o período para a cura, pois a levedura será mais susceptível ao ataque de macrófagos. Além disto, a síntese de quitina não é uma via metabólica comum aos seres humanos, o que abre a possibilidade de utilização de drogas seletivas, com baixos índices de toxicidade e reações adversas. Varias substâncias, obtidas por modelagem molecular, estão sendo testadas para inibir a síntese de quitina, normalmente inibidores competitivos de glucosamina-frutose 6-fosfato aminotransferase similares à glutamina, como anticapsina, FMDP [ácido *N*<sup>3</sup>-(4-metoxifumaroil)-L-2,3-diaminopropanoico] e derivados ADGP (2-amino-2-deoxi-D-glucitol-6-fosfato) e ADMP (2-amino-2-deoxi-D-manitol-6-fosfato) (MILEWSKI, 2002; WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2005). Recentemente, algumas moléculas têm sido testadas com sucesso para a inibição de quitina sintase em *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*, entre elas polioxina, 8,20-diidroxi-9(11),13-abietadien-12-ona e ácido O-metil pisiferico (KANG *et al.*, 2008).

Alguns genes ligados ao metabolismo de ácidos graxos aparecem modulados em resposta a Paraquat<sup>®</sup> com aumento na sua expressão, tais como acil-CoA desidrogenase (MAS0963, MAS 1188, MAC1342), acetil-CoA acetiltransferase (MAC1027) e 3-ceto-CoA tiolase (MAC1318, MAS2238). Lorenz, Bender e Fink (2004) mostraram, utilizando a técnica de microarranjos de DNA, o aumento na expressão de genes ligados à degradação de ácido graxos em *Candida albicans* extraída de macrófagos mamíferos infectados. Fan e colaboradores (2005) identificaram um aumento na expressão de genes ligados ao metabolismo de lipídeos e  $\beta$ -oxidação de ácido graxos em *Cryptococcus neoformans* fagocitado por macrófagos murinos, utilizando também a técnica de microarranjos de DNA com posterior confirmação por qPCR. A degradação de ácidos graxos é uma grande fonte de energia para as células, fornecendo acetil-CoA para os ciclos do ácido cítrico e glioxilato. O aumento na expressão de genes ligados ao ciclo do ácido cítrico e/ou glioxilato e de PEPCCK, junto à metabolização de ácidos graxos, sugerida por estes genes superexpressos em resposta a Paraquat<sup>®</sup>, e o ambiente pobre em glicose do macrófago, podem indicar a utilização de ácidos graxos na obtenção de energia e a ativação da gliconeogênese, como uma fonte alternativa de carbono. Esta utilização de ácidos graxos foi também sugerida em *C. albicans*

(LORENZ, BENDER e FINK, 2004) e *C. neoformans* (FAN *et al.*, 2005) fagocitados por macrófagos. A frutose-6-fosfato, obtida na gliconeogênese, poderia entrar na formação de componentes de parede como as glucanas e a quitina, o que parece acontecer neste fungo, dada a superexpressão de vários genes ligados a síntese de quitina. Assim, estes resultados sugerem fortemente que para sobreviver fagocitado, o fungo deve obter energia a partir da degradação de ácidos graxos e utilizar a gliconeogênese para obter os precursores da parede celular, defendendo-se do ataque macrofágico.

## 6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

O “chip” de *P. brasiliensis*, construído e validado por Nunes e colaboradores (2005) para análise da transição dimórfica deste fungo, mostrou-se eficiente também na análise genômica deste microrganismo em situações de estresse químico (oxidativo e nitroso), o que abre a possibilidade para novos estudos com diferentes drogas e/ou restrições impostas ao fungo. Esta eficiência foi comprovada por altas taxas de concordância entre os dados de microarranjos e PCR quantitativo em tempo real.

Os padrões de expressão esperados de vários genes (inositol 1-fosfato sintase, glicerol 3-fosfato desidrogenase, proteínas de “heat shock”, superóxido dismutase, histidina quinase, 4HPPD, entre outros já descritos na literatura) mostram que o ataque oxidativo foi efetivo. No entanto, foram encontrados alguns genes com padrões de expressão contrários aos esperados, como os genes de antioxidante tiol específico, peroxirredoxina, cobre amino oxidase e ferredoxina. Os padrões de resposta diferentes entre os agentes utilizados e sua divisão em dois grandes grupos sugerem mecanismos diferentes para a defesa do *Paracoccidioides brasiliensis* contra ERNs, baixas doses de peróxido e superóxidos em relação a altas doses destes últimos.

O metabolismo de tirosina, que inclui a enzima 4HPPD, a produção de biotina e via de síntese de quitina merecem atenção especial na luta contra a paracoccidioidomicose e novos estudos devem ser realizados para entendermos melhor o real papel destas vias na busca de possíveis alvos terapêuticos.



## REFERÊNCIAS

AJELLO, L.; POLONELLI, L. Imported paracoccidioidomycosis: a public health problem in non-endemic areas. **European Journal of Epidemiology**, v.1, n. 3, p. 160-165, setembro 1985.

ALBORNOZ, M. B de. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v. 9, n. 3, p. 248-253, novembro 1971.

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

ALMEIDA, I. C.; NEVILLE, D. C.; MEHLERT, A.; TREUMANN, A.; FERGUSON, M. A.; PREVIATO, J. O.; TRAVASSOS, L. R. Structure of the N-linked oligosaccharide of the main diagnostic antigen of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Glycobiology** v. 6, n. 5, p. 507-515, julho 1996, Erratum in: **Glycobiology** v. 6, n. 8, p. VII, dezembro 1996.

ALMEIDA, S. M. de. Central Nervous System Paracoccidioidomycosis: An Overview. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 126-133, abril 2005

ALMEIDA, S. R.; DE MORAES, J. Z.; DE CAMARGO, Z. P.; GESZTESI, J. L.; MARIANO, M.; LOPES, J. D. Pattern of immune response to gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells. **Cellular Immunology**, v. 190, n. 1, p. 68-76, novembro 1998.

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

ANGELOVA, M. B.; PASHOVA, S. B.; SPASOVA, B. K.; VASSILEV, S. V.; SLOKOSKA, L. S. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. **Mycology Research**, v. 109, n. 2, p. 150-158, fevereiro 2005.

ANRAKU, M.; FUJII, T.; FURUTANI, N.; KADOWAKI, D.; MARUYAMA, T.; OTAGIRI, M.; GEBICKI, J. M.; TOMIDA, H. Antioxidant effects of a dietary supplement: Reduction of indices of oxidative stress in normal subjects by water-soluble chitosan. **Food and Chemical Toxicology**, outubro 2008.

ARISTIZABAL, B. H.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A.; RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 11, p. 5587-5591, novembro 1998.

ARULKUMARAN, S.; RAMPRASATH, V. R.; SHANTHI, P.; SACHDANANDAM, P. Alteration of DMBA-induced oxidative stress by additive action of a modified indigenous preparation--Kalpaamruthaa. **Chemico-Biological Interactions**, v. 167, n. 2, p. 99-106, abril 2007.

ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; HOEY, B. M.; BUTLER, J. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. **Biochemical Journal**, v. 256, n. 1, p. 251-255, novembro 1988.

BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K. I. R.; ALQUATI, S.; MIYAJI, M.; DE CAMARGO, Z. P.; GOMES, G. M.; FRANCO, M. F.; MONTENEGRO, M. R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 4, p. 505-512, abril 1998.

BAI, Z.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B. Use of the chemiluminescent probe lucigenin to monitor the production of the superoxide anion radical in a recombinant *Aspergillus niger* (B1-D). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 75, n. 2, p. 204-211, outubro 2001.

BAILIAK, M. M.; ABRAT, O. B.; SEMCHYSHYN, H. M.; LUSHCHAK, V. I. Survival and antioxidant defence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during starvation and oxidative stress. **Ukrainskii Biokhimitseskii Zhurnal**, v. 77, n. 4, p. 93-98, julho-agosto 2005.

BALDECK, J. D.; MARQUIS, R. E. Targets for hydrogen-peroxide-induced damage to suspension and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 10, p. 868-875, outubro 2008.

BARHOUMI, R.; BOWEN, J. A.; STEIN, L. S.; ECHOLS, J.; BURGHARDT, R. C. Concurrent analysis of intracellular glutathione content and gap junctional intracellular communication. **Cytometry**, v. 14, n. 7, p. 747-756, outubro 1993.

BARUA, M.; LIU, Y.; QUINN, M. R. Taurine Chloramine Inhibits inducible Nitric Oxide Synthase and TNF- $\alpha$  Gene Expression in Activation and I $\kappa$ B Kinase Activity. **Journal of Immunology**, v. 167, n. 4, p. 2275-2281, agosto 2001.

BASTOS ASCENÇO SOARES, R. de; GOMEZ, F. J.; DE ALMEIDA SOARES, C. M.; DEEPE, G. S. Jr. Vaccination with heat shock protein 60 induces a protective immune response against experimental *Paracoccidioides brasiliensis* pulmonary infection. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 4214-4221, setembro 2008.

BATINIC-HABERLE, I.; BENOVA, L. T. An SOD mimic protects NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase against oxidative inactivation. **Free Radical Research**, v. 42, n. 7, p. 618-624, julho 2008.

BENABDELLAH, K.; MERLOS, M. A.; AZCÓN-AGUILAR, C.; FERROL, N. GintGRX1, the first characterized glomeromycotan glutaredoxin, is a multifunctional enzyme that responds to oxidative stress. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 1, p. 94-103, janeiro 2009.

BENARD, G.; ROMANO, C. C.; CACERE, C. R.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANNINI, M. J.; DUARTE, A. J. Imbalance of IL-2, IFN- $\gamma$  and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 13, n. 4, p. 248-252, fevereiro 2001.

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

BLOTTA, M. H. S. L.; CAMARGO, Z. P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n. 3, p.671-676, março 1993.

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

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

BOOJAR, M. M.; GOODARZI, F. Oxidative response of rat lung tissue after crown ethers exposure and effects of alpha-tocopherol treatment. **Clinica Chimica Acta**, v. 370, n. 1-2, p. 158-164, agosto 2006.

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

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

BORLAND, A.; ELLIOTT, S.; PATTERSON, S.; TAYBI, T.; CUSHMAN, J.; PATER, B.; BARNES, J. Are the metabolic components of crassulacean acid metabolism up-regulated in response to an increase in oxidative burden? **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 2, p. 319-328, janeiro 2006.

BOUTON, C. Nitrosative and oxidative modulation of iron regulatory proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, n. 8-9, p. 1043-1053, julho 1999.

BRACKEN, S.; BYRNE, G.; KELLY, J.; JACKSON, J.; FEIGHERY, C. Altered gene expression in highly purified enterocytes from patients with active coeliac disease. **BMC Genomics**, v. 9, n. 377, agosto 2008.

BRANCO, R.; CHUNG, A. P.; JOHNSTON, T.; GUREL, V.; MORAIS, P.; ZHITKOVICH, A. The chromate-inducible chrBACF operon from the transposable element TnOtChr confers resistance to chromium(VI) and superoxide. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 21, p. 6996-7003, novembro 2008.

BRIOUKHANOV, A. L.; NETRUSOV, A. I.; EGGEN, R. I. The catalase and superoxide dismutase genes are transcriptionally up-regulated upon oxidative stress in the strictly anaerobic archaeon *Methanosarcina barkeri*. **Microbiology**, v. 152, n. 6, p. 1671-1677, junho 2006.

BRITO, T.; FRANCO, M. F. Granulomatous inflammation. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n. 2, p. 185-192, março-abril 1994.

BROMILOW, R. H. Paraquat and sustainable agriculture. **Pest Management Science**, v. 60, n. 4, p. 340-349, abril 2003.

BROSNAN, J. T.; BROSNAN, M. E. The sulfur-containing amino acids: an overview. **The Journal of Nutrition**, v. 136, suplemento 6, p. 1636S-1640S, junho 2006.

BRUMMER, E.; CASTAÑEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 89-117, abril 1993.

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. **Journal of Immunology**, v. 140, n. 8, p. 2786-2789, abril 1988.

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

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; STEVENS, D. A. Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 10, n. 8, p. 945-952, 1988.

BRYK, R.; GRIFFIN, P.; NATHAN, C. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 211-215, setembro 2000.

BULAWA, C. E.; MILLER, D. W.; HENRY, L. K.; BECKER, J. M. Attenuated virulence of chitin-deficient mutants of *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 92, n. 23, p. 10570-10574, novembro 1995.

BULIK, D. A.; OLCZAK, M.; LUCERO, H. A.; OSMOND, B. C.; ROBBINS, P. W.; SPECHT, C. A. Chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* in response to supplementation of growth medium with glucosamine and cell wall stress. **Eukaryot Cell**, v. 2, n. 5, p. 886-900, outubro 2003.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, n. 1, p. 23-39, agosto 2002.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 597-601, junho 2005.

CALABRESE, V.; LODI, R.; TONON, C.; D'AGATA, V.; SAPIENZA, M.; SCAPAGNINI, G.; MANGIAMELI, A.; PENNISI, G.; STELLA, A. M.; BUTTERFIELD, D. A. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. **Journal of the Neurological Science.**, v. 233, n. 1-2, p. 145-162, junho 2005.

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

CALICH, V. L.; SINGER-VERMES, L. M.; SIQUEIRA, A. M.; BURGER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 66, n. 5, p. 585-594, outubro 1985.

CALVI, S. A.; SOARES, A. M. V. C.; PERAÇOLI, M. T. S.; FRANCO, M.; RUIZ, R. L.; MARCONDES-MACHADO, J.; FECCHIO, D.; MATTOS, M. C.; MENDES, R. P. Study of bronchoalveolar lavage fluid in paracoccidioidomycosis: cytopathology and alveolar macrophage function in response to gamma interferon; comparison with blood monocytes. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 15, p. 1373-1379, dezembro 2003.

CAMARGO, Z. P.; FRANCO, M.F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 17, n. 2, p. 41-48, junho 2000.

CAMARGO, Z. P.; GESZTESI, J.L.; SARAIVA, E.C.; TABORDA, C. P.; VICENTINI, A.P.; LOPES, J. D. Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 2377-2381, outubro 1994.

CAMPOS, E. G.; JESUINO, R. S. A.; DANTAS, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; FELIPE, M. S. Oxidative Stress Response in *Paracoccidioides brasiliensis*, **Genetics and Molecular Research**, v. 4, n. 2, p. 409-429, junho 2005.

CAMPOS, E. V.; SARTORI, J. C.; HETCH, M. L.; DE FRANCO, M. F. Clinical and serologic features of 47 patients with paracoccidioidomycosis treated by amphotericin B. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 26, n. 4, p. 212-217, julho/agosto 1984.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A. C.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. G. Pulmonary Paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 5, p. 1777-1783, maio 1995.

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

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

CASOTTO, M. Characterization of the cellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1188-1193, junho 1990.

CHATTERJEE, S. S.; HOSSAIN, H.; OTTEN, S.; KUENNE, C.; KUCHMINA, K.; MACHATA, S.; DOMANN, E.; CHAKRABORTY, T.; HAIN, T. Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 1323-1338, fevereiro 2006.

CHEN, D.; JANGANAN, T. K.; CHEN, G.; MARQUES, E. R.; KRESS, M. R.; GOLDMAN, G. H.; WALMSLEY, A. R.; BORGES-WALMSLEY, M. I. The cAMP pathway is important for controlling the morphological switch to the pathogenic yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Molecular Microbiology**, v. 65, n.3, p. 761-779, agosto 2007.

CHEUNG, V. G.; MORLEY, M.; AGUILAR, F.; MASSIMI, A.; KUCHERLAPATI, R.; CHILDS, G. Making and reading microarrays. **Nature Genetics**, v. 21, suplemento 1, p. 15-19, janeiro 1999.

CHRISTEN, S.; WOODALL, A. A.; SHIGENAGA, M. K.; SOUTHWELL-KEELY, P. T.; DUNCAN, M. W.; AMES, B. N. Gamma-Tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO<sub>x</sub> and complements alpha-tocopherol: Physiological implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 94, n. 7, p. 3217-3222, abril 1997.

CHUAQUI, R.F.; BONNER, R.F.; BEST, C.J.; GILLESPIE, J.W.; FLAIG, M.J.; HEWITT, S.M.; PHILLIPS, J.L.; KRIZMAN, D.B.; TANGREA, M.A.; AHRAM, M.; LINEHAN, W.M.; KNEZEVIC, V.; EMMERT-BUCK, M.R. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. **Nature Genetics**, v. 32, n. 4, p. 509-514, dezembro 2002.

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

COLEMAN, S. T.; FANG, T. K.; ROVINSKY, S. A.; TURANO, F. J.; MOYE-ROWLEY, W. S. Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 1, p. 244-250, janeiro 2001.

COMTOIS, S. L.; GIDLEY, M. D.; KELLY, D. J. Role of the thioredoxin system and the thiol-peroxidases Tpx and Bcp in mediating resistance to oxidative and nitrosative stress in *Helicobacter pylori*. **Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 121-129, janeiro 2003.

CORREDOR, G. G.; CASTAÑO, J. H.; PERALTA, L. A.; DÍEZ, S.; ARANGO, M.; McEWEN, J.; RESTREPO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in a endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 16, n. 4, p. 216-220, dezembro 1999.

COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZERA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M.; SABROZA, P. C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1441-1454, setembro/ outubro 2002.

COZZI, R.; RICORDY, R.; BARTOLINI, F.; RAMADORI, L.; PERTICONE, P.; DE SALVIA, R. Taurine and ellagic acid: two differently-acting natural antioxidants. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 26, n. 3, p. 248-254, 1995.

COX, R. A.; BEST, G. K. Cell wall composition of two strains of *Blastomyces dermatitidis* exhibiting differences in virulence for mice. **Infection and Immunity**, v. 5, n. 4, p. 449-453, abril 1972.

CRAIG, P. M.; WOOD, C. M.; McCLELLAND, G. B. Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, n. 5, p. R1882-1892, novembro 2007.

CROSS, J. B.; CURRIER, R. P.; TORRACO, D. J.; VANDERBERG, L. A.; WAGNER, G. L.; GLADEN, P.D. Killing of bacillus spores by aqueous dissolved oxygen, ascorbic acid, and copper ions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 2245-2252, abril 2003.

CUNHA, A. F.; SOUZA, M. V.; SILVA, S. P.; JESUÍNO, R. S. A.; SOARES, C. M.; FELIPE, M. S. Identification, N-terminal region sequencing and similarity analysis of differentially expressed proteins in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 37, n. 2, p. 115-121, abril 1999.



CURNUTTE, J. T.; WHITTEN, D. M.; BABIOR, B. M. Defective superoxide production by granulocytes from patients with chronic granulomatous disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 290, n. 11, p. 593-597, março 1974.

DAHER, B. S.; VENANCIO, E. J.; DE FREITAS, S. M.; BAO, S. N.; VIANNEY, P. V.; ANDRADE, R. V.; DANTAS, A. S.; SOARES, C. M.; SILVA-PEREIRA, I.; FELIPE, M. S. The highly expressed yeast gene *pby20* from *Paracoccidioides brasiliensis* encodes a flavodoxin-like protein. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 5, p. 434-443, maio 2005.

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

DANIEL, G.; VOLC, J.; FILONOVA, L.; PLÍHAL, O.; KUBÁTOVÁ, E.; HALADA, P. Characteristics of *Gloeophyllum trabeum* alcohol oxidase, an extracellular source of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in brown rot decay of wood. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 19, p. 6241-6253, outubro 2007.

DEPEINT, F.; BRUCE, W. R.; SHANGARI, N.; MEHTA, R.; O'BRIEN, P. J. Mitochondrial function and toxicity: role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. **Chemico-Biological Interaction**, v. 163, n. 1-2, p. 94-112, outubro 2006.

DERENGOWSKI, L. S.; TAVARES, A. H.; SILVA, S.; PROCÓPIO, L. S.; FELIPE, M. S.; SILVA-PEREIRA, I. Upregulation of glyoxylate cycle genes upon *Paracoccidioides brasiliensis* internalization by murine macrophages and in vitro nutritional stress condition. **Medical Mycology**, v. 46, n. 2, p. 125-134, março 2008.

DÍAZ, I. A. C. On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*. Our hypothesis of 1989: Present status and perspectives. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 2, p. 131-134, março/abril 2007.

DILLON, N. L.; SAMPAIO, S. A.; HABERMANN, M. C.; MARQUES, S. A.; LASTORIA, J. C.; STOLF, H. O.; SILVA, N. C.; CURI, P. R. Delayed results of treatment of paracoccidioidomycosis with amphotericin B plus sulfamides versus amphotericin B alone. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 263-266, julho/agosto 1986.

DIOUDIS, C.; DIMITRIOS, G.; THOMAS, T. H.; WEST, I. C. Abnormal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase binding and glycolytic flux in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease after a mild oxidative stress. **Hippokratia**, v. 12, n. 3, p. 162-167, julho/setembro 2008.

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

DRAPIER, J. C.; WIETZERBIN, J.; HIBBS, J. B. Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 18, n. 10, p. 1587-1592, outubro 1988.

DU, X. L.; JIANG, T.; ZHAO, W. B.; WANG, F.; WANG, G. L.; CUI, M.; WEN, Z. Q. Gene alterations in tumor-associated endothelial cells from endometrial cancer. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 22, n. 5, p. 619-632, novembro 2008.

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

EBRAHIMIAN, T.; TOUYZ, R. M. Thioredoxin in vascular biology: role in hypertension. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 6, p. 1127-1136, junho 2008.

ESTEVES, J. A.; CABRITA, J. D.; NOBRE, G. N. Generalidades e Blastomicose Sul-Americana, In: \_\_. **Micologia Médica**, 2ª ed., Porto: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990, p. 3-266, 793-822.

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

FARISS, M. W.; CHAN, C. B.; PATEL, M.; VAN HOUTEN, B.; ORRENIUS, S. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. **Molecular Interventions**, v. 5, n. 2, p. 94-111, abril 2005.

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

FELIPE, M. S. S.; ANDRADE, R. V.; ARRAES, F. B. M.; NICOLA, A. M.; MARANHÃO, A. Q.; TORRES, F. A. G.; SILVA-PEREIRA, I.; POCAS-FONSECA, M. J.; CAMPOS, E. G.; MORAES, L. M. P.; ANDRADE, P. A.; TAVARES, A. H. F. P.; SILVA, S. S.; KYAW, C. M.; SOUZA, D. P.; PbGENOME NETWORK; PEREIRA, M.; JESUÍNO, R. S. A.; ANDRADE, E. V.; PARENTE, J. A.; OLIVEIRA, G. S.; BARBOSA, M. S.; MARTINS, N.

F.; FACHIN, A. L.; CARDOSO, R. S.; PASSOS, G. A. S.; ALMEIDA, N. F.; WALTER, M. E. M. T.; SOARES, C. M. A.; CARVALHO, M. J.; BRIGIDO, M. M. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in Mycelium and Yeast Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 26, p. 24706-24714, julho 2005.

FINDEISEN, P.; RÖCKEL, M.; NEES, M.; RÖDER, C.; KIENLE, P.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M.; KALTHOFF, H.; NEUMAIER, M. Systematic identification and validation of candidate genes for detection of circulating tumor cells in peripheral blood specimens of colorectal cancer patients. **International Journal of Oncology**, v. 33, n. 5, p. 1001-1010, novembro 2008.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, novembro 2000.

FINLAY, B.B. & FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revised. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 2, p. 136-169, junho 1997.

FLAHERTY, D. M.; MONICK, M. M.; HINDE, S. L. Human alveolar macrophages are deficient in PTEN. The role of endogenous oxidants. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 8, p. 5058-5064, fevereiro 2006

FLINT, D. H.; TUMINELLO, J. F.; EMPTAGE, M. H. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 30, p. 22369-22376, outubro 1993.

FÖRSTERMANN, U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. **Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine**, v. 5, n. 6, p. 338-349, junho 2008.

FRANCO, M. F. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 25, n. 1, p. 5-18, fevereiro 1987.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review Biochemistry**, v. 64, p. 97-112, julho 1995.

FRIDOVICH, I. Superoxide Anion Radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), Superoxide Dismutases, and Related Matters **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 30, p. 18515-18517, julho 1997.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, n. 8, p. 1203-1209, abril 1998.

FUKUSHIMA, T.; YAMADA, K.; ISOBE, A.; SHIWAKU, K.; YAMANE, Y. Mechanism of cytotoxicity of paraquat. I. NADH oxidation and paraquat radical formation via complex I. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 45, n. 5-6, p. 345-349, outubro 1993.

FURUKAWA, Y. Enhancement of glucose induced insulin secretion and modification of glucose metabolism by biotin. **Nippon Rinsho**, v. 57, n. 10, p. 2261-2269, outubro 1999.

GARCIA, N. M.; DEL NEGRO, G. M. B.; HEINS-VACCARI, E. M.; DE MELO, N. T.; DE ASSIS, C. M.; LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*, a new sample isolated from feces of a penguin (*Pygoscelis adeliae*). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 3, p. 227-235, maio/ junho 1993.

GARRIDO, E. O.; GRANT, C. M. Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 993-1003, fevereiro 2002.

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

GERIK, K. J.; BHIMIREDDY, S. R.; RYERSE, J. S.; SPECHT, C. A.; LODGE, J. K. PKC1 is essential for protection against both oxidative and nitrosative stresses, cell integrity, and normal manifestation of virulence factors in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 10, p. 1685-1698, outubro 2008.

GESZTESI, J. L.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R.; VICENTINI, A. P.; DE MORAES, J. Z.; FRANCO, M. F.; LOPES, J. D. Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. **Hybridoma**, v. 15, n. 6, p. 415-422, dezembro 1996.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 6, p. 503-512, junho 2002.

GODON, C.; LAGNIEL, G.; LEE, J.; BUHLER, J. M.; KIEFFER, S.; PERROT, M.; BOUCHERIE, H. TOLEDANO, M. B.; LABARRE, J. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 35, p. 22480-22489, agosto 1998.

GONZALEZ, A.; DE GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Nitric Oxide Participation in the Fungicidal Mechanism of Gamma Interferon-Activated Murine

Macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* Conidia. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 2546–2552, maio 2000.

GONZALEZ, A.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Role of iron in the nitric oxide-mediated fungicidal mechanism of IFN- $\gamma$ -activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 1, p. 11-16, janeiro/ fevereiro 2007.

GORT, A. S.; IMLAY, J. A. Balance between endogenous superoxide stress and antioxidant defenses. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 6, p. 1402-1410, março 1998.

GRAHAM, J. E.; CLARK-CURTISS, J. E.; Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 96, n. 20, p. 11554-11559, setembro 1999.

GRANT, C. M. Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress. **Journal of Biology**, v. 7, n. 1, janeiro 2008.

GRAVEL, R. A.; NARANG, M. A.; Molecular genetics of biotin metabolism: old vitamin, new science. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 16, n. 7, p. 428-431, julho 2005.

GREEN, T. R.; FELLMAN, J. H.; EICHER, A. L.; PRATT, K. L. Antioxidant role and subcellular location of hypotaurine and taurine in human neutrophils. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1073, n. 1, p. 91-97, janeiro 1991.

GREENBERG, J. T.; MONACH, P.; CHOU, J. H.; JOSEPHY, P. D.; DEMPLE, B. Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 87, n. 16, p. 6181-6185, agosto 1990.

GRÜNENFELDER, J.; ZÜND, G.; STUCKI, V.; HOERSTRUP, S. P.; KADNER, A.; SCHOEBERLEIN, A.; TURINA, M. Heat shock protein upregulation lowers cytokine levels after ischemia and reperfusion. **European Surgical Research**, v. 33, n. 5-6, p. 383-387, setembro/ dezembro 2001.

GUPTA, M.; HOGEMA, B. M.; GROMPE, M.; BOTTIGLIERI, T. G.; CONCAS, A.; BIGGIO, G.; SOGLIANO, C.; RIGAMONTI, A. E.; PEARL, P. L.; SNEAD, O. C. 3<sup>RD</sup>; JAKOBS, C.; GIBSON, K. M. Murine succinate semialdehyde dehydrogenase deficiency. **Annals of Neurology**, v. 54, suplemento 6, p. S81-90, 2003.

GÜRER, H.; OZGÜNES, H.; SAYGIN, E.; ERCAL, N. Antioxidant effect of taurine against lead-induced oxidative stress. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 41, n. 4, p. 397-402, novembro 2001.

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

HALL, M. G.; WILKS, M. F.; PROVAN, W. M.; EKSBORG, S.; LUMHOLTZ, B. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of NTBC (2-(2-nitro-4-fluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione) and mesotrione, inhibitors of 4-hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase (HPPD) following a single dose to healthy male volunteers. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 52, n. 2, p. 169-177, agosto 2001.

HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Antioxidant defences. *In*: \_\_\_\_\_. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3<sup>a</sup> ed. Londres: Oxford Science Publications, 2000, cap.3.

HALLIWELL, B.; RAFTER, J.; JENNER, A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1, p. 268S-276S, janeiro 2005.

HANNA, P. M.; MASON, R. P. Direct evidence for inhibition of free radical formation from Cu(I) and hydrogen peroxide by glutathione and other potential ligands using the EPR spin-trapping technique. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 295, n. 1, p. 205-213, maio 1992.

HASSAN, H. M.; FRIDOVICH, I. Paraquat and *Escherichia coli*: mechanism of production of extracellular superoxide radical. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 21, p. 10846-10852, novembro de 1979.

HASSETT, R.; KOSMAN, D. J. Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 1, p. 128-134, janeiro 1995.

HECTOR, R. F. Compounds active against cell walls of medically important fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 1, p. 1-21, janeiro 1993.

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

HOFMAN, P. DNA microarrays. **Nephron Physiology**, v. 99, n. 3, p. 85-89, fevereiro 2005.

HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 4, p. 469-488, outubro 1996.

HORNBY, J. M.; JACOBITZ-KIZZIER, S. M.; McNEEL, D. J., JENSEN, E. C.; TREVES, D. S.; NICKERSON, K. W. Inoculum Size Effect in Dimorphic Fungi: Extracellular Control of Yeast-Mycelium Dimorphism in *Ceratomyces ulmi*, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1356-1359, março 2004.

HORVATHOVA, E.; ECKL, P. M.; BRESGEN, N.; SLAMENOVA, D. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and DMNQ on freshly isolated rat hepatocytes; protective effects of carboxymethyl chitin-glucan. **Neuro Endocrinology Letters**, v. 29, n. 5, p. 644-648, outubro 2008.

HUXTABLE, R. J. Physiological actions of taurine. **Physiological Reviews**, v. 72, n. 1, p. 101-163, janeiro 1992.

IGOILLO-ESTEVE, M.; CAZZULO, J. J. The glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: its role in the defense of the parasite against oxidative stress. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 149, n. 2, p. 170-181, outubro 2006.

IMLAY, J. A. Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 1073-1082, fevereiro 2006.

INDEX FUNGORUM. Disponível em: < <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>>. Acesso em: 21 de outubro de 2008.

ITO, Y.; OUMI, S.; NAGASAWA, T.; NISHIZAWA, N. Oxidative stress induces phosphoenolpyruvate carboxykinase expression in H4IIE cells. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, n. 9, p. 2191-2198, setembro 2006.

IUCHI, S.; WEINER, L. Cellular and molecular physiology of *Escherichia coli* in the adaptation to aerobic environments. **Journal of Biochemistry**, v. 120, n. 6, p. 1055-1063, dezembro 1996.

IZAWA, S.; MAEDA, K.; MIKI, T.; MANO, J.; INOUE, Y.; KIMURA, A. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptive response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Biochemical Journal**, v. 330, pt. 2, p. 811-817, março 1998.

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

JANKEY, N; RAJU, GC; BARROW, S. Paracoccidioidomycosis in Trinidad. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 39, n. 1, p. 83-85, janeiro 1987.

JARRETT, J. T. The novel structure and chemistry of iron-sulfur clusters in the adenosylmethionine-dependent radical enzyme biotin synthase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 433, n. 1, p. 312-321, janeiro 2005.

JAYARAJ, R.; ANAND, T.; RAO, P. V. Activity and gene expression profile of certain antioxidant enzymes to microcystin-LR induced oxidative stress in mice. **Toxicology**, v. 220, n. 2-3, p. 136-146, março 2006.

JENDROSSEK, V.; RITZEL, A.; NEUBAUER, B.; HEYDEN, S.; GAHR, M. An in-frame triplet deletion within the gp91-phox gene in an adult X-linked chronic granulomatous disease patient with residual NADPH-oxidase activity. **European Journal of Haematology**, v. 58, n. 2, p. 78-85, fevereiro 1997.

JO, S. H.; SON, M. K.; KOH, H. J.; LEE, S. M.; SONG, I. H.; KIM, Y. O.; LEE, Y. S.; JEONG, K. S.; KIM, W. B.; PARK, J. W.; SONG, B. J.; HUH, T. L. Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p. 16168–16176, maio 2001.

JOHNSON, C. H.; PRIGGE, J. T.; WARREN, A. D.; MCEWEN, J. E. Characterization of an alternative oxidase activity of *Histoplasma capsulatum*. **Yeast**, v. 20, n. 5, p. 381-388, abril 2003.

KANETSUNA, F.; CARBONELL, L. M.; MORENO, R. E.; RODRIGUEZ, J. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 97, n. 3, p. 1036-1041, março 1969.

KANG, T. H.; HWANG, E. I.; YUN, B. S.; SHIN, C. S.; KIM, S. U. Chitin synthase 2 inhibitory activity of O-methyl pisiferic acid and 8,20-dihydroxy-9(11),13-abietadien-12-one, isolated from *Chamaecyparis pisifera*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 4, p. 755-759, abril 2008.

KANTER, M.; COSKUN, O.; ARMUTCU, F.; UZ, Y. H.; KIZILAY, G. Protective effects of vitamin C, alone or in combination with vitamin A, on endotoxin-induced oxidative renal



tissue damage in rats. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 2, p. 155-162, junho 2005.

KAVANA, M.; MORAN, G. R. Interaction of (4-hydroxyphenyl) pyruvate dioxygenase with the specific inhibitor 2-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzoyl]-1,3-cyclohexanedione. **Biochemistry**, v. 42, n. 34, p. 10238-10245, setembro 2003.

KAWASAKI, L.; AGUIRRE, J. Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 4, p. 1434-1440, fevereiro 2001.

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. DBGET Search – ENZYME. Disponível em: <[http://www.kegg.com/dbget-bin/www\\_bfind?enzyme](http://www.kegg.com/dbget-bin/www_bfind?enzyme)>. Acesso em: 23 setembro 2008.

KEITH, K. E.; KILLIP, L.; HE, P.; MORAN, G. R.; VALVANO, M. A. *Burkholderia cenocepacia* C5424 produces a pigment with antioxidant properties using a homogentisate intermediate. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 24, p. 9057-9065, dezembro 2007.

KIM, S. J.; JUNG, E. M.; JUNG, H. J.; SONG, Y. S.; PARK, E. H.; LIM, C. J. Cellular functions and transcriptional regulation of a third thioredoxin from *Schizosaccharomyces pombe*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 775-783, junho 2007.

KLETZIEN, R. F.; HARRIS, P. K.; FOELLM, L. A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. **The FASEB Journal**, v. 8, n. 2, p. 174-181, fevereiro 1994.

KLOTZ, M. G.; KLASSEN, G. R.; LOEWEN, P. C. Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, n. 9, p. 951-958, setembro 1997.

KNIGHT, H.; TREWAVAS, A. J.; KNIGHT, M. R. Cold calcium signaling in Arabidopsis involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. **The Plant Cell**, v. 8, n. 3, p. 489-503, março 1996.

KNIGHT, H.; TREWAVAS, A. J.; KNIGHT, M. R. Calcium signalling in Arabidopsis thaliana responding to drought and salinity. **The Plant Journal**, v. 12, n. 5, p. 1067-1078, novembro 1997.

KOHEN, R.; CHEVION, M. Transition metals potentiate paraquat toxicity. **Free Radical Research Communications**, v. 1, n. 2, p. 79-88, 1985a.

KOHEN, R.; CHEVION, M. Paraquat toxicity is enhanced by iron and reduced by desferrioxamine in laboratory mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 34, n. 10, p.1841-1843, maio 1985b.

KORBASHI, P.; KOHEN, R.; KATZHENDLER, J.; CHEVION, M. Iron Mediates Paraquat Toxicity in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 27, p. 12472-12476, setembro 1986.

KWON, E.S.; JEONG, J.H.; ROE, J.H. Inactivation of Homocitrate Synthase Causes Lysine Auxotrophy in Copper/Zinc-containing Superoxide Dismutase-deficient Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 3, p. 1345-1351, janeiro 2006.

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

LACAZ, C. S.; VIDAL, M. S. M.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T.; DEL NEGRO, G. M. B.; ARRIAGADA, G. L. H.; FREITAS, R. S. *Paracoccidioides brasiliensis*. A Mycologic and Immunochemical Study of two strains. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 2, p. 79-86, março/ abril 1999.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T.; Paracoccidioidomicose, In: \_\_. **Tratado de Micologia Médica**, 9ª ed., São Paulo: Sarvier 2002, p. 639-729.

LACERDA, G. B.; ARCE-GOMES, B.; TELLES FILHO, F. Q. Increased frequency of HLA-B40 in patients with paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 26, n. 4, p. 253-256, 1988.

LACERDA, G. B.; ARCE-GOMEZ, B., HLA e paracoccidioidomicose. In: **Encontro sobre Paracoccidioidomicose 2**, Botucatu. Anais. p. 9, 1983.

LARSSON, C.; PÅHLMAN, I. L.; ANSELL, R.; RIGOULET, M.; ADLER, L.; GUSTAFSSON L. The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, n. 4, p. 347-357, março 1998.

LATINI, A.; SCUSSIATO, K.; LEIPNITZ, G.; GIBSON, K. M.; WAJNER, M. Evidence for oxidative stress in tissues derived from succinate semialdehyde dehydrogenase-deficient mice. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 30, n. 5, p. 800-810, outubro 2007.

LAU, A. T.; HE, Q. Y.; CHIU, J. F. A proteome analysis of the arsenite response in cultured lung cells: evidence for *in vitro* oxidative stress-induced apoptosis. **The Biochemical Journal**, v. 382, parte 2, p. 641-650, setembro 2004.

LAYER, G.; HEINZ, D. W.; JAHN, D.; SCHUBERT, W. D. Structure and function of radical SAM enzymes. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, n. 5, p. 468-476, outubro 2004.

LAZAROVÁ, M.; LÁBAJ, J.; KOGAN, G.; SLAMENOVÁ, D. Carboxymethyl chitin-glucan enriched diet exhibits protective effects against oxidative DNA damage induced in freshly isolated rat cells. **Neoplasma**, v. 53, n. 5, p. 434-439, 2006.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *In: \_\_.Princípios de Bioquímica*, São Paulo: Sarvier 2000, segunda reimpressão.

LEITE, D. B. **Análise da transição micélio-levedura do fungo patogênico humano *Paracoccidioides brasiliensis* através de hibridação em microarranjos de DNA**. Mogi das Cruzes, 2005. 74p. Dissertação de Mestrado – Universidade de Mogi das Cruzes.

LÉVESQUE, C. M.; MAIR, R. W.; PERRY, J. A.; LAU, P. C.; LI, Y. H.; CVITKOVITCH, D. G. Systemic inactivation and phenotypic characterization of two-component systems in expression of *Streptococcus mutans* virulence properties. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 398-404, outubro 2007.

LI, J. R.; YU, P. Expression of Cu, Zn-superoxide dismutase gene from *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia pastoris* and its resistance to oxidative stress. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136, n. 1, p. 127-139, janeiro 2007.

LI, Q.; ABRASHEV, R.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B. Oxidative stress-associated impairment of glucose and ammonia metabolism in the filamentous fungus, *Aspergillus niger* B1-D. **Mycological Research**, v. 112, pt. 9, p. 1049-1055, setembro 2008.

LIU, J.; FELDMAN, P.; CHUNG, T. D. Real-time monitoring in vitro transcription using molecular beacons. **Analytical Biochemistry**, v. 300, n. 1, p. 40-45, janeiro 2002.

LIU, Y.; TONNA-DEMASI, M.; PARK, E.; SCHULLER-LEVIS, G.; QUINN, M. R. Taurine chloramines inhibits production of nitric oxide and prostaglandin E2 in activated C6 glioma

cells by suppressing inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression. **Brain Research. Molecular Brain Research**, v. 59, n. 2, p. 189-195, agosto 1998.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, dezembro 2001.

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

LORENZ, M. C.; FINK, G. R. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. **Nature**, v. 412, n. 6842, p. 83-86, julho 2001.

LUDEWIG, F.; HÜSER, A.; FROMM, H.; BEAUCLAIR, L.; BOUCHÉ, N. Mutants of GABA transaminase (POP2) suppress the severe phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase (ssadh) mutants in *Arabidopsis*. **PLoS ONE**, v. 3, n. 10, e. 3383, outubro 2008.

LUIJERINK, M.; JACOBS, S.M.; VAN BEURDEN, E. A.; KOORNNEEF, L. P.; KLOMP, L. W.; BERGER, R.; VAN DEN BERG, I. E. Extensive changes in liver gene expression induced by hereditary tyrosinemia type I are not normalized by treatment with 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione (NTBC). **Journal of Hepatology**, v. 39, n. 6, p. 901-909, dezembro 2003.

LUSHCHAK, O. V.; LUSHCHAK, V. I. Sodium nitroprusside induces mild oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Redox Report**, v. 13, n. 4, p. 144-152, agosto 2008.

MACEDO R.; LACERA M.; TRILLES-REIS R. Infecção natural de tatus por *Paracoccidioides brasiliensis* em Serra da Mesa, Goiás: Estudo preliminar. **Anais do II Congresso Brasileiro de Micologia**. Abstract 182. Rio de Janeiro. 1998.

MACHIDA, K.; TANAKA, T. Farnesol-induced generation of reactive oxygen species dependent on mitochondrial transmembrane potential hyperpolarization mediated by F(0)F(1)-ATPase in yeast. **FEBS Letters**, v. 462, n. 1-2, p. 108-112, novembro 1999.

MAILLOUX, R. J.; BÉRIAULT, R.; LEMIRE, J.; SINGH, R.; CHÉNIER, D. R.; HAMEL, R. D.; APPANNA, V. D. The tricarboxylic acid cycle, an ancient metabolic network with a novel twist. **PLoS ONE**, v. 2, n. 1, e. 690, agosto 2007.

MALLOZZI, C.; DI STASI, A. M.; MINETTI, M. Free radicals induce reversible membrane-cytoplasm translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in human erythrocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 321, n. 2, p. 345-352, agosto 1995.

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

MARESCA, B.; KOBAYASHI, G. S. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a Model for the Study of Cell Differentiation in Pathogenic Fungi. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 186-209, junho 1989.

MARQUES, A. F.; DA SILVA, M. B.; JULIANO, M. A.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2814-2819, agosto 2006.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 73, n. 5, p. 455-469, 1998.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose: Atualização epidemiológica, clínica, e terapêutica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 2, p. 135-150, março/abril 2003.

MARQUES da SILVA, S.H.; CAMARGO, Z.P. Detention of gp43 and gp70 as circulating antigens of *P. brasiliensis* and follow up of patients under antimycotic therapy. In: International Meeting on Paracoccidioidomycosis. Águas de Lindóia, S. Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, suplemento 14, p. 8, 2005.

MARQUES da SILVA, S.H.; COLOMBO, A. L.; BLOTTA, M. H. S. L.; QUEIROZ-TELLES, F.; BALTHAZAR, A. B.; LOPES, J. D.; PIRES de CAMARGO, Z. Diagnosis of Paracoccidioidomycosis by Detection of Antigen and Antibody in Bronchoalveolar Lavage Fluids. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 12, p. 1363-1366, dezembro 2006.

MARTIN, E.; ROSENTHAL, R. E.; FISKUM, G. Pyruvate dehydrogenase complex: metabolic link to ischemic brain injury and target of oxidative stress. **Journal of Neuroscience Research**, v. 79, n. 1-2, p. 240-247, janeiro 2005.

MARTÍNEZ, A.; DALFÓ, E.; MUNTANÉ, G.; FERRER, I. Glycolytic enzymes are targets of oxidation in aged human frontal cortex and oxidative damage of these proteins is increased in

progressive supranuclear palsy. **Journal of Neural Transmission**, v. 115, n. 1, p. 59-66, janeiro 2008.

MATES, J. M.; SANCHEZ-JIMENEZ, F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. **Frontiers in Bioscience**, v. 15, n. 4, p. D339-345, março 1999.

MATTNER, J.; WANDERSEE-STEINHAUSER, A.; PAHK, A.; ROLLINGHOFF, M.; MAJEAU, G. R.; HOCHMAN, P. S.; BOGDAN, C. Protection against progressive leishmaniasis by IFN- $\gamma$ . **Journal of Immunology**, v. 172, n.12, p. 7574-7582, junho 2004.

McEWEN, J. G.; BEDOYA, V.; PATINO, M. M.; SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 25, n. 3, p. 165-175, junho 1987a.

McEWEN, J. G.; RESTREPO, B. I.; SALAZAR, M. E., RESTREPO, A. Nuclear staining of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 25, n. 5, p. 343-345, outubro 1987b.

MEDOFF, G.; SACCO, M.; MARESCA, B.; SCHLESSINGER, D.; PAINTER, A.; KOBAYASHI, G. S.; CARRATU, L. Irreversible block of the mycelial-to-yeast phase transition of *Histoplasma capsulatum*, **Science**, v. 231, n 4737, p. 476-479, janeiro 1986.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; BUENO, J. P.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; FERREIRA, A. W.; MASUDA, A. Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 12, p. 2842-2845, dezembro 1989.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; BUENO, J. P.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; STOLF, A. M. S.; MASUDA, A.; AMATO NETO, V.; FERREIRA, A. W. Antibody response to the 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 43, n. 2, p. 200–206, agosto 1990.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; RICCI, L. C.; UEMURA, M.A.; TOSCANO, E.; ARNS, C. W. Infection and apparent invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 32, n. 3, p. 189-197, 1994.

MENDIS, E.; KIM, M. M.; RAJAPAKSE, N.; KIM, S. K. An in vitro cellular analysis of the radical scavenging efficacy of chitooligosaccharides. **Life Sciences**, v. 80, n. 23, p. 2118-2127, maio 2007.

MILEWSKI, S. Glucosamine-6-phosphate synthase the multi-facets enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1597, n. 2, p. 173-192, junho 2002.

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

MIRON, M.; WOODY, O. Z.; MARCIL, A.; MURIE, C.; SLADEK, R.; NADON, R. A methodology for global validation of microarray experiments. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 333, julho 2006.

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

MONNIER, V.; GIRARDOT, F.; AUDIN, W.; TRICOIRE, H. Control of oxidative stress resistance by IP3 kinase in *Drosophila melanogaster*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 9, p. 1250-1259, novembro 2002.

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

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

MOREIRA, A. P.; DIAS-MELICIO, L. A.; PERAÇOLI, M. T.; CALVI, S. A.; VICTORIANO DE CAMPOS SOARES, A. M. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN-gamma and TNF-alpha activated murine peritoneal macrophages: evidence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO effector mechanisms. **Mycopathologia**, v. 166, n. 1, p. 17-23, julho 2008.

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

NAGL, M.; HESS, M. W.; PFALLER, K.; HENGSTER, P.; GOTTARDI, W. Bactericidal activity of micromolar N-clorotaurine: evidence for its antimicrobial function in the human

defense system. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2507-2513, setembro 2000.

NAIFF, R. D.; BARRETO, T. Novos registros de *Paracoccidioides brasiliensis* em tatus (*Dasypus novemcinctus*). **Anais do Congresso Brasileiro de Parasitologia**, Abstract 197. Rio de Janeiro. 1989.

NAIFF, R. D.; FERREIRA, L. C. L.; BARRET, T. V.; NAIFF, M. F.; RAMON ARIAS, J. Paracoccidioidomicose em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Estado do Pará. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 1, p. 19-27, janeiro/ fevereiro 1986.

NAKAMURA, H.; MATSUDA, M.; FURUKE, K.; KITAOKA, Y.; IWATA, S.; TODA, K.; INAMOTO, T.; YAMAOKA, Y.; OZAWA, K.; YODOI, J. Adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin protects endothelial F-2 cell injury caused by activated neutrophils or hydrogen peroxide. **Immunology Letters**, v. 42, n 1-2, p. 75-80, setembro 1994.

NAKASHIMA, T.; TANIKO, T.; KURIYAMA, K. Therapeutic effect of taurine administration on carbon tetrachloride-induced hepatic injury. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 32, n. 4, p. 583-589, agosto 1982.

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

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

NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. **The Journal Clinical Investigation**, v. 79, n. 2, p. 319-326, fevereiro 1987.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 04 de novembro de 2008.

NEGRONI, P. The *Paracoccidioides brasiliensis* lives saprophytically in the soil of Argentina. **Prensa Médica Argentina**, v. 53, n. 39, p. 2381-2382, setembro 1966.



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

NOBRE, V.; BRAGA, E.; RAYES, A.; SERUFO, J. C.; GODOY, P.; NUNES, N.; ANTUNES, C. M.; LAMBERTUCCI, J. R. Opportunistic infections in patients with AIDS admitted to an university hospital of the southeast of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 2, p. 69-74, março/ abril 2003.

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

NYHUS, K. J.; JACOBSON, E. S. Genetic and Physiologic Characterization of Ferric/Cupric Reductase Constitutive Mutants of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 5, p. 2357-2365, maio 1999.

OJIMA, Y.; NISHIOKA, M.; TAYA, M. Metabolic alternations in SOD-deficient *Escherichia coli* cells when cultivated under oxidative stress from photoexcited titanium dioxide. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 6, p. 1107-1113, junho 2008.

OSMOND, B. C.; SPECHT, C. A.; ROBBINS, P. W. Chitin synthase III: synthetic lethal mutants and "stress related" chitin synthesis that bypasses the CSD3/CHS6 localization pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 96, n. 20, p. 11206-11210, setembro 1999.

PARK, J. B.; LEVINE, M. Purification, cloning and expression of dehydroascorbic acid-reducing activity from human neutrophils: identification as glutaredoxin. **The Biochemical Journal**, v. 315, n. 3, p. 931-938, maio 1996.

PEDERSEN, J. Z.; STEINKÜHLER, C.; WESER, U.; ROTILIO, G. Copper-glutathione complexes under physiological conditions: structures in solution different from the solid state coordination. **BioMetals**, v. 9, n. 1, p. 3-9, janeiro 1996.

PIMENTEL, M. C. **Análise Genômica Funcional da Resposta ao Estresse Nitrosativo no Fungo *Paracoccidioides brasiliensis***. Mogi das Cruzes, 2007. 81p. Dissertação de Mestrado – Universidade de Mogi das Cruzes.

PINTO, A. R.; PUCCIA, R.; DINIZ, S. N.; FRANCO, M. F.; TRAVASSOS, L. R. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Vaccine**, v.18, n. 26, p. 3050–3058, julho 2000.

PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P. A. J.; TRAVASSOS, L. R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infection and Immunity**, v. 53, n. 1, p. 199-206, julho 1986.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS L. R. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 1610-1615, agosto 1991.

PUREV, M.; KIM, M. K.; SAMDAN, N.; YANG, D. C. Isolation of a novel fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene from *Codonopsis lanceolata* and analysis of the response of this gene to abiotic stresses. **Molekuliarnaia Biologiya**, v. 42, n. 2, p. 206-213, março/ abril 2008.

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

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

RALSER, M.; WAMELINK, M. M.; KOWALD, A.; GERISCH, B.; HEEREN, G.; STRUYS, E. A.; KLIPP, E.; JAKOBS, C.; BREITENBACH, M.; LEHRACH, H.; KROBITSCH, S. Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. **Journal of Biology**, v. 6, n. 4, artigo 10, dezembro 2007.

RAMOS e SILVA, M.; SARAIVA, L. E. S. Paracoccidioidomycosis. **Dermatologic Clinics**, v. 26, n. 2, p. 257-269, abril 2008.

REA, G.; METOUI, O.; INFANTINO, A.; FEDERICO, R.; ANGELINI, R. Copper amine oxidase expression in defense responses to wounding and *Ascochyta rabiei* invasion. **Plant Physiology**, v. 128, n. 3, p. 865-875, março 2002.

REDMOND, H. P.; WANG, J. H.; BOUCHIER-HAYES, D. Taurine attenuates nitric oxide- and reactive oxygen intermediate-dependent hepatocyte injury. **Archives of Surgery**, v. 131, n. 12, p. 1280-1287, dezembro 1996.

REINARTZ, M.; DING, Z.; FLÖGEL, U.; GÖDECKE, A.; SCHRADER, J. Nitrosative stress leads to protein glutathiolation, increased s-nitrosation, and up-regulation of peroxiredoxins in the heart. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 25, p. 17440-17449, junho 2008.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, v. 23, n. 5, p. 323-334, outubro 1985.

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

RESTREPO, A.; RESTREPO, M.; RESTREPO, F.; ARISTIZÁBAL, L. H.; MONCADA, L.H.; VELES, H. Immune responses in paracoccidioidomycosis. A controlled study of 16 patients before and after treatment. **Sabouraudia**, v. 16, n. 2, p. 151-163, junho 1978.

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

RICCI G.; MOTA F. T.; WAKAMATSU A.; SERAFIM, R. C.; BORRA, R. C.; FRANCO M. F. Canine paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology** v. 42, n. 4, p. 379-383, agosto 2004.

RICCI, S.; JANULCZYCK, R.; BJÖRCK, L. The regulator PerR is involved in oxidative stress response and iron homeostasis and is necessary for full virulence of *Streptococcus pyogenes*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, p. 4968-4976, setembro 2002.

RIGOLET M, AGUILANIU H, AVÉRET N, BUNOUST O, CAMOUGRAND N, GRANDIER-VAZEILLE X, LARSSON C, PAHLMAN IL, MANON S, GUSTAFSSON L. Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 256-257, n. 1-2, p. 73-81, janeiro 2004.

RODRIGUEZ-MELENDZ, R.; CANO, S.; MÉNDEZ, S. T.; VELÁZQUEZ, A. Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 7, p. 1909-1913, julho 2001.

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

ROSENSTOCK, T. R.; ABÍLIO, V. C.; FRUSSA-FILHO, R.; KIYOMOTO, B. H.; SMAILL, S. S. Old mice present increased levels of succinate dehydrogenase activity and lower vulnerability to dyskinetic effects of 3-nitropropionic acid. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 91, n. 3, p. 327-332, janeiro 2009.

RUPRICH-ROBERT, G.; CHAPELAND-LECLERC, F.; BOISNARD, S.; FLORENT, M.; BORIES, G.; PAPON, N. Contributions of the response regulators Ssk1p and Skn7p in the pseudohyphal development, stress adaptation, and drug sensitivity of the opportunistic yeast *Candida lusitaniae*. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 6, p. 1071-1074, junho 2008.

SADAHIRO, A.; DIOGP, C. L.; OSHIRO, T. M.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Kinetics of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-4 production by mononuclear cells stimulated with gp43 peptides, in patients cured of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 156-162, março/ abril 2007.

SAH, N. K.; SINGH, S. N.; SAHDEV, S.; BANERJI, S.; JHA, V.; KHAN, Z.; HASNAIN, S. E. Indian herb "Sanjeevani" (*Selaginella bryopteris*) can promote growth and protect against heat shock and apoptotic activities of ultra violet and oxidative stress. **Journal of Biosciences**, v. 30, n. 4, p. 499-505, setembro 2005.

SAHOO, R.; DUTTA, T.; DAS, A.; SINHA RAY, S.; SENGUPTA, R.; GHOSH, S. Effect of nitrosative stress on *Schizosaccharomyces pombe*: inactivation of glutathione reductase by peroxynitrite. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, n. 4, p. 625-631, fevereiro 2006.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In: R.L. Cihlar and R.A. Calderone (eds.), **Fungal pathogenesis: principles and clinical applications**, Marcel Dekker, Inc. New York, N.Y. 2001.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. Molecular aspects of fungal dimorphism. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 101-127, 1984.

SANO, A.; NISHIMURA, K.; HORIE, Y.; FRANCO, M.; MENDES, R. P.; COELHO, K. I. R.; SCAPOLIO, S. H. B.; FUKUSHIMA, K.; DE CAMARGO, Z. P.; MIYAJI, M.; MONTENEGRO, M. R. Antigenic similarities to *Paracoccidioides brasiliensis* in thermo-dependent dimorphic fungi isolated from soil in Botucatu, SP, Brazil. **Mycopathologia**, v. 138, n. 1, p. 37-41, julho 1997.

SASAKI, Y.; ASAMIZU, E.; SHIBATA, D.; NAKAMURA, Y.; KANEKO, T.; AWAI, K.; AMAGAI, M.; KUWATA, C.; TSUGANE, T.; MASUDA, T.; SHIMADA, H.; TAKAMIYA, K.; OHTA, H.; TABATA, S. Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis* by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and

crosstalk with other phytohormone signaling pathways. **DNA Research**, v. 8, n. 4, p. 153-161, agosto 2001.

SCHMALER-RIPCKE, J.; SUGAREVA, V.; GEBHARDT, P.; WINKLER, R.; KNIEMEYER, O.; HEINEKAMP, T.; BRAKHAGE, A. A. Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 493-503, janeiro 2009.

SCHNAPPINGER, D.; EHRT, S.; VOSKUIL, M. I.; LIU, Y.; MANGAN, J. A.; MONAHAN, I. M.; DOLGANOV, G.; EFRON, B.; BUTCHER, P. D.; NATHAN, C.; SCHOOLNIK, G. K. Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 5, p. 693-704, setembro 2003.

SEKIGUCHI, T.; NAGAMINE, T. Inhibition of free radical generation by biotin. **Biochemical Pharmacology**, v. 47, n. 3, p. 594-596, fevereiro de 1994.

SELITRENNIKOFF, C. P.; NAKATA, M. New cell wall targets for antifungal drugs. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 4, n. 2, p. 200-205, fevereiro 2003.

SERRA, A.; DOMINGOS, F.; PRATA, M. M. Intoxicação por Paraquat®. **Acta Médica Portuguesa**, v. 16, n. 1, p. 25-32, janeiro/ fevereiro 2003.

SEVERO, L. C.; LONDERO, A. T.; GEYER, G. R.; PORTO, N. S. Acute pulmonary paracoccidiodomycosis in an immunosuppressed patient. **Mycopathologia**, v. 68, n. 3, p. 171-174, setembro 1979.

SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; SIBLEY, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 40-79, janeiro 1999.

SHENTON, D.; GRANT, C. M. Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **The Biochemical Journal**, v. 374, pt 2, p. 513-519, setembro 2003.

SHI, X.; FLYNN, D. C.; PORTER, D. W.; LEONARD, S. S.; VALLYATHAN, V.; CASTRANOVA, V. Efficacy of taurine based compounds as hydroxyl radical scavengers in silica induced peroxidation. **Annal of Clinical and Laboratory Science**, v.27, n. 5, p. 365-374, setembro/ outubro 1997.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; DUARTE, M. I. S.; NUNES, D. F.; LACAZ, C. S.; SABAGGA, E.; ABDALA, E.; DUARTE, A. J. S.; LOPES, M. H. B. M. Paracoccidioidomycosis in a renal transplant recipient. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 33, n. 6, p. 411-414, novembro/ dezembro 1995.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; FILHO, F. Q. T.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. Consenso em paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297-310, maio/ junho 2006.

SHON, Y. H.; PARK, I. K.; MOON, I. S.; CHANG, H. W.; PARK, I. K.; NAM, K. S. Effect of chitosan oligosaccharide on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 9, p. 1161-1164 setembro 2002.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291-295, março 1997.

SIES, H.; SHAROV, V. S.; KLOTZ, L. O.; BRIVIBA, K. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 44, p. 27812-27817, outubro 1997.

SILVA, C. L.; ALVES, L. M. M.; FIGUEIREDO, F.. Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbiology**, v. 140, n. 5, p. 1189-1194, maio 1994.

SILVA, J. P.; PROENÇA, F.; COUTINHO, O. P. Protective role of new nitrogen compounds on ROS/RNS-mediated damage to PC12 cells. **Free Radical Research**, v. 42, n. 1, p. 57-69, janeiro 2008.

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

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

SILVA, S. S.; PAES, H. C.; SOARES, C. M.; FERNANDES, L.; FELIPE, M. S. Insights into the pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis* from transcriptome analysis advances and perspectives. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 249-258, abril/ maio 2008.

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

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R., CAMARGO, Z. P.; MALTA, M. H. B.; MAFFEI, C. M. L.; CHADU J. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Medical Mycology**, v. 38, n. 3, p. 193-199, junho 2000.

SIROVER, M. A. Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 66, n. 2, p. 133-140, agosto 1997.

SITTHISAK, S.; HOWIESON, K.; AMEZOLA, C.; JAYASWAL, R. K. Characterization of a multicopper oxidase gene from *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5650-5653, setembro 2005.

SLAMENOVÁ, D.; LÁBAJ, J.; KRIZKOVÁ, L.; KOGAN, G.; SANDULA, J.; BRESGEN, N.; ECKL, P. Protective effects of fungal (1->3)-beta-D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. **Cancer Letters**, v. 198, n. 2, p. 153-160, agosto 2003.

SLANE, B. G.; AYKIN-BURNS, N.; SMITH, B. J.; KALEN, A. L.; GOSWAMI, P. C.; DOMANN, F. E.; SPITZ, D. R. Mutation of succinate dehydrogenase subunit C results in increased O<sub>2</sub><sup>-</sup>, oxidative stress, and genomic instability. **Cancer Research**, v. 66, n. 15, p. 7615-7620, agosto 2006.

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

SOUTHERN CALIFORNIA COASTAL WATER RESEARCH PROJECT. **Causes of Endocrine Disruption in Fish**. Disponível em: <http://www.sccwrp.org/view.php?id=280>. Acesso em: 09 de fevereiro de 2009.

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

STRYER, L. Geração e Armazenamento de Energia Metabólica. In: \_\_\_\_\_. **Bioquímica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1992 parte III.

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

SUGAR, A. M.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Paracoccidioidomycosis in the immunosuppressed host: report of a case and review of the literature. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 129, n. 2, p. 340-342, fevereiro 1984.

SUZUKI, Y. J.; FORMAN, H. J.; SEVANIAN, A. Oxidants as stimulators of signal transduction. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, n. 1-2, p. 269-285, 1997

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

TAKAHASHI, S.; KATAGIRI, T.; HIRAYAMA, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Hyperosmotic stress induces a rapid and transient increase in inositol 1,4,5-trisphosphate independent of abscisic acid in *Arabidopsis* cell culture. **Plant & Cell Physiology**, v. 42, n. 2, p. 214-222, fevereiro 2001.

TANAKA, T.; HIJIOKA, H.; FUJITA, K.; USUKI, Y.; TANIGUCHI, M.; HIRASAWA, E. Oxidative stress-dependent inhibition of yeast cell growth by farnesylamine and its possible relation to amine oxidase in the mitochondrial fraction. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, n. 6, p. 470-476, 2004.

TAVARES, A. H.; SILVA, S. S.; BERNARDES, V. V.; MARANHÃO, A. Q.; KYAW, C. M.; POÇAS-FONSECA, M.; SILVA-PEREIRA, I. Virulence insights from the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, n. 2, p. 372-389, junho 2005.

TAVARES, A. H.; SILVA, S. S.; DANTAS, A.; CAMPOS, E. G.; ANDRADE, R. V.; MARANHÃO, A. Q.; BRÍGIDO, M. M.; PASSOS-SILVA, D. G.; FACHIN, A. L.; TEIXEIRA, S. M.; PASSOS, G. A.; SOARES, C. M.; BOCCA, A. L.; CARVALHO, M. J.; SILVA-PEREIRA, I.; FELIPE, M. S. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 5, p. 583-590, abril 2007.

TEIMOURI, F.; AMIRKABIRIAN, N.; ESMAILY, H.; MOHAMMADIRAD, A.; ALIAHMADI, A.; ABDOLLAHI, M. Alteration of hepatic cells glucose metabolism as a



non-cholinergic detoxication mechanism in counteracting diazinon-induced oxidative stress. **Human and Experimental Toxicology**, v. 25, n. 12, p. 697-703, dezembro 2006.

TIMOFEYEV, M. A.; SHATILINA, Z. M.; KOLESNICHENKO, A. V.; BEDULINA, D. S.; KOLESNICHENKO, V. V.; PFLUGMACHER, S.; STEINBERG, C. E. W. Natural organic matter (NOM) induces oxidative stress in freshwater amphipods *Gammarus lacustris* Star and *Gammarus tigrinus* (Sexton). **The Science of the Total Environment**, v. 366, n. 2-3, p. 673-681, agosto 2006.

TOMITA, M.; OKUYAMA, T.; KATSUYAMA, H.; ISHIKAWA, T. Paraquat-induced gene expression in rat kidney. **Archives of Toxicology**, v. 80, n. 10, p. 687-693, outubro 2006.

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

TRAVERSO, J. A.; VIGNOLS, F.; CAZALIS, R.; PULIDO, A.; SAHRAWY, M.; CEJUDO, F. J.; MEYER, Y.; CHUECA, A. PsTRXh1 and PsTRXh2 are both pea h-type thioredoxins with antagonistic behavior in redox imbalances. **Plant Physiology**, v. 143, n. 1, p. 300-311, janeiro 2007.

TU, Z. Z.; WANG, K. K.; ZOU, J.; LIU, K.; DENG, G. H.; XIAO, X. Z. Oxidative stress-induced accumulation of heat shock protein 70 within nucleolus. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 30, n. 4, p. 384-389, agosto 2005.

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

VALAVANIDIS, A.; VLAHOYIANNI, T.; FIOTAKIS, K. Comparative study of the formation of oxidase damage maker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct from the nucleoside 2'-deoxyguanosine by transition metals and suspensions of particulate matter in relation to metal content and redox reactivity. **Free Radical Research**, v. 39, n. 10, p. 1071-1081, outubro 2005.

VALLE, A.C.F.; GUIMARÃES, R.R.; LOPES, D.J.; CAPONE, D. Aspectos radiológicos torácicos na paracoccidiodomicose. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 2, p. 105-115, março-abril 1992.

VALLE, A. C. do; COSTA, R. L.; FIALHO MONTEIRO, P. C.; VON HELDER, J.; MUNIZ, M. M.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidiodomycosis. **Medical Mycology**, v. 39, n. 4, p. 373-377, agosto 2001.

VEERESHWARAYYA, V.; KUMAR, P.; ROSEN, K. M.; MESTRIL, R.; QUERFURTH, H. W. Differential effects of mitochondrial heat shock protein 60 and related molecular chaperones to prevent intracellular beta-amyloid-induced inhibition of complex IV and limit apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 40, p. 29468-29478, outubro 2006.

VENANCIO, E. J., KYAW, C. M.; MELLO, C. V., DA SILVA, S. P.; SOARES, C. M. A.; FELIPE, M. S., SILVA-PEREIRA, I. Identification of differentially expressed transcripts in the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by differential display. **Medical Mycology**, v. 40, n. 1, p. 45-51, fevereiro 2002.

VENKATRAMAN, M.; KONGA, D.; PERAMAIYAN, R.; GANAPATHY, E.; DHANAPAL, S. Reduction of mitochondrial oxidative damage and improved mitochondrial efficiency by administration of crocetin against benzo[ $\alpha$ ]pyrene induced experimental animals. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 9, p.1639-1645, setembro 2008.

VICENTINI, A. P.; GESZTESI, J. L.; FRANCO, M. F.; DE SOUZA, W.; DE MORAES, J. Z.; TRAVASSOS, L. R.; LOPES, J. D. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 4, p. 1465-1469, abril 1994.

WANG, S. C.; FREY, P. A. S-adenosylmethionine as an oxidant: the radical SAM superfamily. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 3, p. 101-110, março 2007.

WANG, Y.; CAO, Y. Y.; JIA, X. M.; CAO, Y. B.; GAO, P. H.; FU, X. P.; YING, K.; CHEN, W. S.; JIANG, Y. Y. Cap1p is involved in multiple pathways of oxidative stress response in *Candida albicans*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, n. 7, p. 1201-1209, abril 2006.

WANG, Y.; RUSSO, T. A.; KWON, O.; CHANOCK, S.; RUMSEY, S. C.; LEVINE, M. Ascorbate recycling in human neutrophils: induction by bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 94, n. 25, p. 13816-13819, dezembro 1997.

WEI, Y. H.; LEE, H. C. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. **Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)**, v. 227, n. 9, p. 671-682, outubro 2002.

WINTERBOURN, C. C. Production of hydroxyl radicals from Paraquat radical and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **FEBS Letters**, v. 128, n. 2, p. 339-342, junho 1981.

WOJCIECHOWSKI, M.; MILEWSKI, S.; MAZERSKI, J.; BOROWSKI, E. Glucosamine-6-phosphate synthase, a novel target for antifungal agents. Molecular modelling studies in drug design. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 3, p. 647-653, agosto 2005.

WRIGHT, C. E.; TALLAN, H. H.; LIN, Y. Y.; GAULL, G. E. Taurine: biological update. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 427-453, 1986.

WYCKOFF, E. E.; PISHKO, E. J.; KIRKLAND, T. N.; COLE, G. T. Cloning and expression of a gene encoding a T-cell reactive protein from *Coccidioides immitis*: homology to 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and the mammalian F antigen. **Gene**, v. 161, n. 1, p. 107-111, agosto 1995.

XING, R.; YU, H.; LIU, S.; ZHANG, W.; ZHANG, Q.; LI, Z.; LI, P. Antioxidant activity of differently regioselective chitosan sulfates in vitro. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 1387-1392, fevereiro 2005.

YANG, J.; PANEK, H. R.; O'BRIAN, M. R. Oxidative stress promotes degradation of the Irr protein to regulate haem biosynthesis in *Bradyrhizobium japonicum*. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 209-218, abril 2006.

YANG, L.; TANG, R.; ZHU, J.; LIU, H.; MUELLER-ROEBER, B.; XIA, H.; ZHANG, H. Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants constitutively expressing AtIpk2beta, an inositol polyphosphate 6-/3-kinase from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v. 66, n. 4, p. 329-343, março 2008.

YANG, Y. H.; DUDOIT, S.; LUU, P.; LIN, D. M.; PENG, V.; NGAI, J.; SPEED, T. P. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 4, e. 15, p. 1-10, fevereiro 2002.

ZAKI, M. H.; AKUTA, T.; AKAIKE, T. Nitric oxide-induced nitrate stress involved in microbial pathogenesis. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 98, n. 2, p. 117-129, junho 2005.

ZAVASCKI, A. P.; BIENARDT, J. C.; SEVERO, L. C. Paracoccidioidomycosis in organ transplant recipient: case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 5, p. 279-281, setembro/ outubro 2004.

**ANEXOS**

## A – PRIMERS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE qPCR

Gene	Direção	Seqüência (5'-3')
Fenilacetato 2 hidroxilase	F	CCGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
	R	GGATTCTCAGCCCAATCTCA
Cisteína dioxigenase	F	CCCGTTGACTTTCATTTTCGT
	R	CGCACTGAGGTCATCTACCA
HSP16	F	CCCAAAGACACGAACAACCT
	R	ATGGGTGGGTATGATGGCTA
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	F	TCCCAAATCTCTCAGCAACC
	R	AAGCTGCTGGAAGAAACGAA
Ferrodoxina	F	AAAGCCGGCAAATACTTCCT
	R	TACAACGTACATGCCCCGTA
Peroxiirredoxina	F	GACGCTGGTAGGGTGTTTGT
	R	GATCTGCCAGGAATCGGATA
Antioxidante tiol específico	F	TCGCTCTGCAAACAGAGAGTCCTT
	R	AGGAGCACGATGTTCTTCAGCCAT
Superóxido dismutase Cu/Zn	F	CGCGGCTTTCACATCCATCAGTTT
	R	GGCAGATGTGCAGCCATTGGTATT
Biotina sintase	F	TCACGATACAACACCGGCCTGAAA
	R	CGCTTCAAGAACGGAATCGACAGT
Glutationa peroxidase	F	GCGCTGACCAAAAACCTTCTC
	R	TCCTGAGCAAAGTTGACGTG
Proteína Y20 de <i>P. brasiliensis</i>	F	GTGCTGGAACCTATGCTGGT
	R	GACGGCTCTTCGAGTCATTC
4-HPPD	F	TCTTACGGCAGCATTAAACACGG
	R	GTCGCTGGATGATTTGTGCGAGTT
Carnitina aciltransferase	F	GATCTTGTTGAATGCGCTGA
	R	CTGCAACTGCTTTCCAATCA
Transportador de cobre (alta afinidade)	F	CTTTCCTGGGCTTCTTTGTG
	R	TGCCAGCATCTTTTTGTTTG
Ubiquinol-citocromo C redutase	F	GGATTTCCCGGTATCCAAGT
	R	CTGCGTTGAGGAGTTCTTCC
YMR002w – controle endógeno	F	CCTGCTGGCAAGCTTTCAGTTGAT
	R	GGCGTTTAGAAAGTGCATGGACGA

**B – MEIO DE CULTURA YPD****MEIO LÍQUIDO**

Extrato de levedura	10g
Peptona de caseína	20g
Dextrose	20g
Água milli Q	q.s.p. 1000mL
	pH 6,3

**MEIO SÓLIDO**

Extrato de levedura	10g
Peptona de caseína	20g
Dextrose	20g
Agar bacteriológico	20g
Água milli Q	q.s.p. 1000mL
	pH 6,3

**C – SOLUÇÃO DE HIBRIDAÇÃO**

SSC	6X
Denhardt's	5X
DNA esperma de salmão	0,25 mg/ mL
SDS	0,5%
Formamida	50%
Poli dT	0,925 mg/ mL

**D – SOLUÇÕES DE LAVAGEM DA HIBRIDAÇÃO****SOLUÇÃO DE MÉDIA ESTRINGÊNCIA**

SSC	0,5X
SDS	0,01%

**SOLUÇÃO DE ALTA ESTRINGÊNCIA**

SSC	0,06X
SDS	0,01%

**SOLUÇÃO DE PÓS-LAVAGEM**

SSC	0,06X
-----	-------

SSC – Solução de cloreto e citrato de sódio

NaCl	0,15 M
Citrato de sódio	0,15 M
	pH 7,2



# 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](#)