

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS**

**Haroldo Cesar de Oliveira**

**INFLUÊNCIA DO COBRE NO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS  
NA INTERAÇÃO DE *Paracoccidioides brasiliensis* COM A MATRIZ EXTRACELULAR**

**Araraquara  
2010**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS**

**Haroldo Cesar de Oliveira**

**INFLUÊNCIA DO COBRE NO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS  
NA INTERAÇÃO DE *Paracoccidioides brasiliensis* COM A MATRIZ EXTRACELULAR**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

***ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini***

**Araraquara  
2010**

## **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

O48i Oliveira, Haroldo Cesar de  
Influência do cobre no padrão de expressão de genes envolvidos na interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com a matriz extracelular / Haroldo Cesar de Oliveira – Araraquara, 2010.  
70 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia  
Orientador: Maria José Soares Mendes Giannini

1. Paracoccidioides brasiliensis. 2. Matriz extra celular. 3. RDA (Representational Difference Analysis). 4. Paracoccidioidomicose. I. Giannini, Maria José Soares Mendes, orient. II. Título.

**CAPES: 40300005**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/SP – UNESP e recebeu auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – (processo nº 08/56476-5).

*"It's not a hill... it's a mountain"*

*U2*

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha mãe Irene, meu pai Antônio e minha irmã Erica. Fica difícil expressar o quanto vocês são importantes, e vocês já sabem disso. Mas com certeza, toda caminhada que começo ela só é mais fácil porque sempre tenho o apoio de vocês. Agradeço todos os dias por poder contar com vocês, além de ser eternamente grato por todo carinho, dedicação e esforço despendido para eu poder chegar neste momento que sei ser tão especial para vocês como é para mim, por isso, e muito mais, dedico este trabalho a vocês.*

*Dedico também à Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini. Depois de tanto tempo, trabalhar com você foi a melhor escolha. Desde pequeno frequentando a Micologia sem saber que lá iria me encontrar. Agradeço, e muito, a oportunidade e a confiança depositada. Muito obrigado por todo o aprendizado, orientação e pela melhor oportunidade de crescimento pessoal e profissional, muito obrigado.*

*Em especial, dedico este trabalho também a mais duas pessoas: Marcelo Teruyuki Matsumoto e Julhiany de Fátima da Silva. Com certeza, vocês foram decisivos e essenciais em todo o trabalho. Agradeço toda a dedicação, paciência (OBS.: muita paciência), amizade e companheirismo. Muito obrigado por tudo que me ensinaram e tudo o que me ajudaram. Com certeza, além de meu, este trabalho é de vocês também. Sem palavras pra expressar minha gratidão. Por isso, um muito obrigado, de coração, já vale muito.*

### **Laboratório de Micologia Clínica (Só MICOLOGIA para os íntimos)... um pequeno review!**

Escrever sobre a Micologia não é fácil! Nem sei por onde começar e nem sei se consigo terminar! Não é somente um laboratório, é um lugar onde tudo pode acontecer e só quem está lá sabe do que estou falando e sabe que tenho razão no que falo! Quando cheguei lá, nem entrar eu entrava! Ficava lá fora esperando até a Fer me colocar pra dentro (Obrigado Fer... mas também tinha medo de vocês... rrsrs). Depois que entrava, trabalhava e nem falava com ninguém! Mas isso passou logo, e bem antes do que imaginava, já estava falando e muito lá dentro (sem parar pra respirar), pois de repente, me vi cercado de cada figura... e cada uma delas se tornou mais do que especial para mim! E depois que entrei, quanta gente entrou também e muito rápido já se tornaram especiais também! Lá, o dia começa muito cedo e geralmente termina tarde! Começa com um dos melhores momentos: o Café da Manhã! Sempre hilário. Seja da "Xuxa" ou mais "simplesinho", sempre é hilário e único! Geralmente formado por um quinteto, mas que sempre cabe mais um ou dois ou dez, não importa, sempre cabe mais! E assim começa o dia: cafezinho, pão com manteiga e muita risada! Lógico que às vezes tem o chocolate, o suco, o presunto, o queijo, o tomate, o pão de queijo, o pão de salame, o salame sozinho mas com poucos pontos de gordura, o pão da Rosemira, o pão da padaria da Rô, a broa de milho, os bolos com o que tem no armário, o patê de alho... enfim... um banquete... e sempre acompanhado de muita risada! Impossível começar o dia mal assim... bom pelo menos agente tenta! E assim o dia começa, sempre um pouco tumultuado! Mas lá agente se entende... até demais! Lá tem dias que são Santos e dias nem tão Santos assim, mas sempre sobrevivemos... aliás às vezes ficamos meio preocupados em sobreviver aos dias Santos, que geralmente são mais perigosos que os dias não Santos (afinal idéias como rolar na grama, subir no telhado ou bater a cabeça sempre aparecem na cabeça das pessoas)! Mas, até hoje, sobrevivemos! Os almoços por lá são memoráveis! No cardápio, desde pratos como feijoada, passando por almoço tipicamente japonês, chegando até o pernil, macarronada, escondidinho, cassulê, lasanha, strogonoff, etc, etc e etc! Ah, além disso, têm as sobremesas, como pudim especial (só quem comeu sabe), bala de côco, bolo de cenoura, doce de leite, doce de abóbora e mais uma vez, etc, etc e etc! Mas, além de comer muito, também trabalhamos muito lá! E o bom de trabalhar, é poder trabalhar com os melhores, e lá na micologia, podemos! Lá, compartilhamos nossos dias não com colegas de trabalhos e sim amigos de uma vida toda, e isso tornam as coisas muito mais fáceis e prazerosas, sendo que todas as vitórias são vibradas por todos e todos os deslizes compartilhados e solidarizados por todos! Isso faz com que a Micologia se torne um lugar mais que especial! Afinal de contas, em que outro lugar eu encontraria uma pessoa que gosta de ficar embaixo da bancada e que chora enquanto faz contas (fora que ela ouve vozes vindas do outro quarto todo dia!), uma pessoa que voa (isso mesmo, ela voa), uma pessoa que mia (ah, além de ter uma mania de perseguição muito acentuada), uma pessoa que faz os outros rirem até nos enterros (Saudade dela), uma pessoa que rouba P1000 e faz muito barulho (é, isso pode ser um vício, precisa tratar), uma pessoa que podia estar roubando, matando, mas ela só está lá fazendo o mestrado dela, uma pessoa que dá a risada mais engraçada e tem uma estranha obsessão por joaninhas, uma pessoa que pensa muito (mais ou menos dois dias) pra te dar uma resposta, uma pessoa que não alcança o fluxo e fica nervosinha se a louça do almoço sobra pra ela, uma pessoa que gosta de abraçar (ela precisa), uma pessoa que tem sonhos um pouco estranhos, que lê muito e que tem uma sede insaciável, uma pessoa que pergunta de mais, uma pessoa que fala muito (ela não para, mas agente perdoa afinal ela cozinha muito bem), uma pessoa que fala sozinha e que conhece o Xandy e muita gente mais que especial que chegaram a pouco e algumas que estão para chegar. E além desse povo, ali tem uma pessoa "muuuito" especial que cuida dessa galera com seu jeitinho meigo e agitado de ser, que briga e dá muita bronca em todo mundo, mas que ninguém lá de dentro consegue ficar longe dela... e que quando ela não está por perto todo mundo sente que falta alguma coisa lá dentro! Pois é... assim que vivemos lá dentro, rodeados de momentos e pessoas mais que especiais! Sabe que certa vez, logo que entrei no mestrado, uma tal de Madame Jujú, lendo as cartas para mim (sim até essa experiência eu tive na micologia) me disse o seguinte: "Puxa, sua vida está mudando... virou de cabeça pra baixo de uma hora pra outra não é? (Nessa hora eu já arregalei o olho... e olha que foi a primeira carta). E ela continuou: "Não pra te desanimar... mas até o fim, muita coisa vai acontecer... (Comecei a ficar desesperado nessa hora)! Mas aí ela me disse o seguinte: "Mas apesar disso, saiba que você está em um lugar muito especial, e que está rodeado de pessoas que além de sofrerem com você, estão prontas pra te ajudar... ah... e de coração viu! A partir deste dia tive a certeza de estar no melhor lugar que podia, rodeado de pessoas muito especiais além é claro de comprovar que as cartas não mentem! Bom, resumindo, isso é a Micologia, essencial em todos os sentidos!!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela minha família, meus amigos, minha saúde e pela força e tranquilidade que faz com que todos os dias possam ser nada mais que mais uma grande oportunidade de grande aprendizagem, Obrigado!

À todos os amigos da Micologia: *Marcelo (Pai da Yuna), Julhiany (Vocês estão falando de mim, não é?), Lili (Escuta o Gu chamando), Fer Sangalli (Cadê meu microfone?), Tati (que Tati?), Suélen (Andreia), Aline (Saudade), Carol (Tattoo... hihhi), Panta (Carol.. ou "Bicho à toa"), Lú, Roberta (Muuuito obrigado por toda a ajuda!!! Ah... Tá me devendo uma mini-prep!), Dani (Me dá um abraço?), Fer (Patrícia), Jaque, Daniel (Por que?), Regina (Uai!), Jú Pitica, Nayla, Thaís, Warley, Laranja, Rosália, Torres e Valter. Muito obrigado por tornar cada minuto mais do que especial, não podia pedir lugar melhor para trabalhar. Com certeza, em cada linha deste trabalho tem um pouquinho de todos os momentos que passei com vocês e de tudo o que vocês significam para mim!*

À *Rô* por ser essa pessoa mais que especial! Agradeço por todas as risadas, broncas, cafés, almoços, etc. Faltam palavras para agradecer toda a ajuda, ensinamentos, carinho, preocupação, conselhos e o convívio mais que especial!

À *Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida* por toda a colaboração, confiança e por sempre trabalhar muito (e muito mesmo) para que não nos falte nada dentro do laboratório... além das risadas garantidas nas horas de descontração!

Aos agregados da Micologia, *Eliana, Bel da Cito, Marisinha da Imuno, Benê, Márcia e Rita*. Muito obrigado pelo convívio sempre repleto de muita risada. Em especial à *Rosemira* (apesar de ter me abandonado) e a *Tirene* (Tô com fome sai da frente!) por dividirem os momentos mais que hilários dos cafés da manhã!

A todos os meus grandes e eternos amigos que me acompanharam durante essa e muitas as outras importantes etapas da minha vida: *Gutão (Féla), Jú (Desorientada), Rê (Velhota), João (pai da Alice), Sá (Que sono!), Thaís (Legal), Fer Polverari, Talita (Mermão), Paula (mãe do Mariano... saudade!), Amanda (Purga... obrigado por todo o empenho e disponibilidade na hora de marcar o Real Time, e por todo o carinho com o qual você me trata sempre!), Xande (Sem Noção), Michele, Pizzaia, Renata, Rafa (mãe do Jú), Estevam (parceiro não importa a hora), Dú (rapaz de paciência), Charles (Ou Davi), Glauber, Rô (mãe da Alice), Dani (mãe do Pulgônio meu sobrinho), Feijão, Cesário, Aline (Kbça), Carlão (Gato), Tati (Motorista), Cris, Jú Rossi, Yumi (Telebalada), Camila, Paty, Abrahão, Joana, Lê e todos aqueles que significam muito para mim, mas que por ventura me esquecido! Muito obrigado por todos os momentos, toda a atenção, preocupação, curtidão e grande amizade! Depois de um tempo, você percebe que o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem da vida! Amo todos vocês!*

À *Daniella de Barros Rossetto* do Laboratório de Biologia Molecular e Celular de Microrganismos (FCFAR Unesp) por toda a colaboração, disponibilidade e atenção durante a realização dos últimos seqüenciamentos.



A todos os professores e funcionários que trabalham para o bom andamento do curso de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia! Lembrando das secretárias da pós, *Cláudia, Sônia, Laura, Ângela e Márcia* pela paciência e apoio nas atividades acadêmicas!

Aos professores *Eduardo Bagagli* e *Christiane Pienna Soares* pelas valiosas sugestões como membros da banca do exame de qualificação, aos professores *Carlos Pelleschi Taborda* e *Vera Calich* pela recepção em seus laboratórios e ao professor *Gil Bernard* pelo auxílio para a execução do seqüenciamento das minhas amostras!

À todos os avós, tios, tias, primos e primas, agradeço por todo apoio e confiança e todos os momentos memoráveis que passamos juntos, amo todos vocês!

A *FAPESP* pelo apoio financeiro!

E por último, mas não menos importante... *Meredith, Derek, Cristina, O'Malley, Izzie, Karev, Denny, "Chief" Webber, Bayley, Burke, Addison, Sloan, Callie, Lexie, Hunt, Robbins, Teddy, Avery, Percy, Reed...* muito obrigado por todos (e olha que foram muitos) momentos de desabafo!

...

*"They take pictures of mountain climbers at the top of the mountain. They're smiling... Ecstatic... Triumphant! They don't take pictures along the way. The relentless climb. The pain and anguish of taking it to the next level. Nobody takes pictures of that. We just want to remember the view from the top. The breathtaking moment at the edge of the world. That's what keeps us climbing. That's the crazy part. It's worth anything!"*

*Meredith Grey*

Agradeço a todos que citei acima por fazerem com que as dificuldades durante minha "escalada" fossem momentos importantes para reconhecer minha capacidade e mostrar que nestes momentos o mais importante é sempre o aprendizado que os acompanha! E por fim, agradeço a vocês novamente por dividirem comigo "a bela visão no topo da montanha" depois dessa grande "escalada"!

**MUITO OBRIGADO!!!**

## SUMÁRIO

<b>Lista de sigla, abreviaturas e símbolos</b>	12
<b>Lista de figuras</b>	14
<b>Lista de tabelas</b>	15
<b>Resumo</b>	16
<b>Abstract</b>	17
<b>1. Introdução</b>	26
<b>2. Justificativa</b>	23
<b>3. Objetivos</b>	27
3.1. Estratégias experimentais	27
<b>4. Materiais e Métodos</b>	28
4.1. Preparo dos meios de cultura	28
4.2. Microrganismo	28
4.3. Ensaio de Adesão de <i>P. brasiliensis</i> à componentes da MEC	29
4.3.1. Sensibilização de placas com componentes da MEC	29
4.3.2. Adesão de <i>P. brasiliensis</i> à componentes da MEC	29
4.4. Análise de expressão diferencial de genes	30
4.4.1. Extração de RNA total e síntese de cDNA	30
4.4.2. Metodologia de RDA ( <i>Representational Difference Analysis</i> )	30
4.4.2.1. Síntese de cDNA fita simples	30
4.4.2.2. Síntese de cDNA fita dupla	31
4.4.2.3. Digestão com <i>Sau3AI</i>	31
4.4.2.4. Anelamento do primeiro par de adaptadores	32

4.4.2.5. Ligação do primeiro par de adaptadores	32
4.4.2.6. Teste de ligação do primeiro par de adaptadores	32
4.4.2.7. Primeira subtração	33
4.4.2.8. Amplificação dos produtos diferenciais da primeira subtração	33
4.4.2.9. Segunda amplificação	34
4.4.3. Ligação dos fragmentos em vetor de clonagem	34
4.4.4. Preparo de células competentes para transformação por eletroporação	35
4.4.5. Transformação de células de <i>E. coli</i> por eletroporação	35
4.4.6. Extração de DNA plasmidial em microplaca	36
4.4.7. Seqüenciamento	37
4.4.8. Análise das seqüências	37
4.4.9. Validação dos resultados por RT-PCR e PCR em Tempo Real (Real Time PCR)	38
4.4.10. Confirmação dos resultados por PCR em Tempo Real	36
4.5. Análise de expressão diferencial de proteínas	39
4.5.1. Preparo dos extratos protéicos de <i>P. brasiliensis</i>	39
4.5.2. Análise protéica por Eletroforese Bidimensional	40
<b>5. Resultados</b>	<b>41</b>
5.1. Adesão de <i>P. brasiliensis</i> aos componentes da MEC	41
5.2. Análise de genes diferencialmente expressos por <i>P. brasiliensis</i> após depleção de cobre frente aos	42

componentes da MEC	
5.2.1. Extração de RNA total de <i>P. brasiliensis</i> depletado de Cobre	42
5.2.2. Ensaio de RDA	42
5.2.3. Produtos diferencialmente expressos	43
5.2.4. Confirmação dos resultados	
5.2.4.1. Validação da expressão diferencial por RT-PCR	47
5.2.4.2. Validação da expressão diferencial por PCR em Tempo Real - <i>Real Time PCR</i>	48
5.3. Análise de proteínas diferencialmente expressas por <i>P. brasiliensis</i> após depleção de Cobre frente aos componentes da MEC	49
5.3.1. Extração total de proteínas de <i>P. brasiliensis</i> depletado de Cobre	49
5.3.2. Análise protéica por Eletroforese Bidimensional	49
<b>6. Discussão</b>	<b>53</b>
<b>7. Conclusões</b>	<b>62</b>
<b>8. Referências</b>	<b>63</b>

## Lista de Siglas, Abreviaturas e Símbolos

A	Adenina
BCS	Batocuproinadisulfonato sódico
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BPS	Batofenantrolinadisulfonato
C	Citosina
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
Cu	Cobre
ddNTP	Didesoxirribonucleosídeo(s) trifosfato(s)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleosídeo(s) trifosfato(s)
DO	Densidade ótica
ECM	<i>Extra Cellular Matrix</i>
EE-EPPS	[N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-3-propanesulfonic acid]
EST	Sequência expressa/ <i>Expressed Sequence Tags</i>
Fe	Ferro
Freq	Frequência
G	Guanina
g	giros
GTE	Glicose/Tris-HCl/EDTA
IPTG	Isopropil-tio- $\beta$ -D-galactopiranosídeo
ITS	Internal transcribed spacer
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
MEC	Matriz Extra Celular
MVM	McVeigh & Morton
mW	Peso molecular
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
pb	Pares de bases
PBS	Tampão salina fosfato

PCM	Paracoccidiodomicose
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDE	Produto Diferencialmente Expresso
pl	Ponto Isoelétrico
RDA	<i>Representational Difference Analysis</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RT	Transcriptase reversa/ <i>Reverse transcriptase</i>
SDS-Page	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
T	Timina
TBE	Tris/Ácido Bórico/EDTA
TE	Tris/EDTA
U	Uracila
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoli- $\beta$ -galactopiranosídeo
Zn	Zinco
$\Omega$	Ohm

## Lista de figuras

- Figura 1.** Gráficos representativos da adesão de *P. brasiliensis* a Laminina (A), Fibronectina (B), Colágeno tipo I (C) e Colágeno tipo IV (D), em diferentes condições de cultivo do fungo. \*  $p \leq 0,05$ . 41
- Figura 2.** Produtos diferencialmente expressos de *P. brasiliensis* após depleção de cobre frente aos componentes da MEC. P, Marcador de tamanho molecular de 1Kb (Fermentas); A, Produtos diferencialmente expressos (PDE) Situação Pb sem cobre frente a Laminina, 1<sup>a</sup> subtração (1/10) e 2<sup>a</sup> subtração (1/100) respectivamente; B, PDE Situação Pb sem cobre frente a Fibronectina, 1<sup>a</sup> subtração (1/10) e 2<sup>a</sup> subtração (1/100) respectivamente; C, PDE Situação Pb sem cobre frente a colágeno tipo I, 1<sup>a</sup> subtração (1/10) e 2<sup>a</sup> subtração (1/100) respectivamente; E, PDE Situação Pb sem cobre frente a colágeno tipo IV, 1<sup>a</sup> subtração (1/10) e 2<sup>a</sup> subtração (1/100) respectivamente. 43
- Figura 3.** Classificação funcional dos cDNAs derivados do ensaio de RDA de *P. brasiliensis* após depleção de cobre frente aos componentes da MEC. Classificação baseada no programa Gene Ontology. 45
- Figura 4.** Confirmação da expressão diferencial por RT-PCR. A) Gel e gráfico representado a intensidade das bandas para o gene L34; B) Gel e gráfico representado a intensidade das bandas para Enolase; C) Gel e gráfico representado a intensidade das bandas para a Glicoproteína Indutora de Citocina; D) Gel e gráfico representado a intensidade das bandas para RDS. Nas figuras os números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 representam consecutivamente Pb sem Cobre, Pb sem cobre frente a Laminina, Pb sem cobre frente a Fibronectina, Pb sem cobre frente a Colágeno tipo I, Pb sem cobre frente a Colágeno tipo IV e Controle Negativo. 47
- Figura 5:** Quantificação dos transcritos diferencialmente expressos por Real Time PCR. A) Quantificação da expressão de Enolase frente à Laminina (2), Fibronectina (3), Colágeno tipo I (4) e Colágeno tipo IV (5). B) Quantificação da expressão de Glicoproteína induzida por citocina frente à Fibronectina (3) e Colágeno tipo I (4). 48
- Figura 6:** Eletroforese bidimensional de A) *P. brasiliensis* sem cobre; B) *P. brasiliensis* sem cobre frente a Laminina. 406 spots com pl variando 50

entre 2.4 a 9.7 e massa molecular entre 6 a 104 kDa

**Figura 7:** Eletroforese bidimensional de A) *P. brasiliensis* sem cobre; B) *P. brasiliensis* sem cobre frente à Fibronectina. 439 spots com pI variando entre 4.2 a 9.6 e massa molecular entre 11 e 103 kDa 50

**Figura 8:** Eletroforese bidimensional de A) *P. brasiliensis* sem cobre; B) *P. brasiliensis* sem cobre frente à Colágeno tipo I. 477 spots com pI variando entre 2.4 a 7.9 e massa molecular entre 5 e 91 kDa 51

**Figura 9:** Eletroforese bidimensional de A) *P. brasiliensis* sem cobre; B) *P. brasiliensis* sem cobre frente à Colágeno tipo IV. 407 spots com pI variando entre 3.8 a 9.5 e massa molecular entre 12 e 112 kDa 51



## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Situações analisadas pelo ensaio de RDA	32
<b>Tabela 2.</b> Análise dos clones seqüenciados obtidos de <i>P. brasiliensis</i> após depleção de cobre frente aos diferentes componentes da MEC, após aplicação da técnica de RDA nas seguintes situações 1) Sem cobre + Laminina, 2) Sem cobre + Fibronectina, 3) Sem cobre + Colágeno Tipo I e 4) Sem Cobre + Colágeno Tipo IV.	44
<b>Tabela 3.</b> Proteínas hipotéticas ou preditas	46
<b>Tabela 4.</b> Análise de proteínas diferencialmente expressas frente à depleção de Cobre	52

## Resumo

*Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) é o agente etiológico da paracoccidioidomicose, micose sistêmica de grande importância no Brasil, país que possui a maior concentração de áreas endêmicas para essa doença no mundo. Uma das estratégias possivelmente utilizadas pelo patógeno seria a expressão de genes envolvendo adaptação às condições do hospedeiro, que pode também estar relacionadas à captação de micronutrientes. A matriz extracelular (MEC) desempenha um papel importante na regulação da adesão celular, diferenciação, migração e proliferação das células. Este estudo propõe uma análise de transcritos e de proteínas expressas em condições de depleção de cobre, na presença de quatro matrizes extracelulares – laminina, fibronectina e colágeno I e IV, mimetizando as condições de infecção por *P. brasiliensis* por meio das técnicas de RDA (*Representational Difference Analysis*) e eletroforese bidimensional. Para isso, o isolado Pb01 foi cultivado por 3 horas no meio quimicamente definido (MVM), depletado de cobre (Cu) e a seguir colocado em contato com os quatro diferentes componentes da MEC e a adesão foi avaliada por citometria de fluxo. Um aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) na adesão frente a todos os componentes da MEC foi observado quando o fungo foi cultivado sem Cu. Então, o RNA e os extratos protéicos foram obtidos de Pb sem Cu e Pb sem Cu em contato com os diferentes componentes da MEC. Ensaios de RDA foram realizados para demonstrar os genes envolvidos neste processo. Duas hibridizações foram realizadas nas proporções de 1:10 e 1:100 de *tester* e *driver*, respectivamente, com um excesso de *driver* para remover as seqüências comuns em ambas condições. Os produtos diferencialmente expressos foram amplificados, resultando em padrões distintos que foram seqüenciados revelando genes envolvidos em diferentes processos como virulência (25%), síntese de proteínas (25%), metabolismo (19%), energia (7%), transcrição (6%), transporte (6%), estresse (6%) e do ciclo celular (6%). RDS1 e enolase foram as mais expressas em contato com os quatro componentes da MEC, bem como a glicoproteína induzida por citocina (CIG1). A análise por PCR em tempo real evidenciou que enolase foi mais expressa em contato com laminina, seguido de colágeno tipo IV, enquanto que CIG1 foi mais expressa frente à fibronectina. Enolase foi descrita como uma das adesinas de Pb; RDS1 pode estar relacionada a condições de estresse como privação de nutrientes, incluindo ferro e cobre e CIG1 pode estar envolvida na retenção de ferro na superfície da célula e/ou na captação de ferro por sideróforos. Os extratos protéicos foram caracterizados por eletroforese bidimensional e, em geral, observou-se de 164 a 242 proteínas (*spots*) com pI variando de 2,4 a 9,6 e massa molecular de 5 a 112 kDa quando depletado de Cu e a análise comparativa do perfil protéico demonstrou a existência de 118 proteínas semelhantes entre Pb sem Cu e Pb sem Cu em contato com laminina, 140 em contato com a fibronectina, 220 em contato com o colágeno tipo I, e em contato com o colágeno tipo IV e, além disso, também foram observados 105, 127, 125 e 86 proteínas exclusivas entre Pb sem Cu e Pb sem Cu em contato com laminina, fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV, respectivamente. Este estudo contribui para entender como o fungo reage frente à depleção de cobre e em condições simulando o hospedeiro.

## Abstract

*Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) is the etiologic agent of paracoccidioidomycosis, a systemic mycosis of great importance in Brazil, which has the highest concentration of endemic areas for this disease in the world. One of the strategies used by the pathogen may be the expression of proteins related to the adaptation to the host conditions, which may also be related to the uptake of micronutrients. Extracellular matrix (ECM) plays an important role in the regulation of cell adhesion, differentiation, migration and proliferation of cells. This study proposes an analysis of transcripts and proteins expressed in condition of copper depletion in the presence of four components of extracellular matrix - laminin, fibronectin and collagen I and IV, mimicking the conditions of infection by *P. brasiliensis*, using techniques of RDA (*Representational Difference Analysis*) and two-dimensional electrophoresis. For this, we cultured the Pb 01 strain at 3 hours in a chemically defined media (MVM) with depletion copper (Cu). After, the fungus was placed at contact with the four different ECM components and the adhesion was evaluated by flow cytometry. A significant increase of binding ( $p \leq 0,05$ ) to all ECM components was observed when the fungal was cultured without Cu. So RNA and protein extracts were obtained of Pb without Cu, and Pb without Cu in contact with the different ECM components. RDA assay was developed to demonstrate the genes involved in this process. Two hybridizations were performed in the proportions of 1:10 and 1:100 of *tester* and *driver* respectively, with an excess of *driver* to remove the common sequences in both conditions. The differentially expressed products were amplified, resulting in distinct patterns that were sequenced revealing genes involved in different process like virulence (25%), protein synthesis (25%), metabolism (19%), energy (7%), transcription (6%), transport (6%), stress response (6%) and cell cycle (6%). RDS1 and enolase were expressed more in contact with the four components of ECM, as well as the glycoprotein-induced cytokine (CIG1). Analysis by real time PCR showed that enolase was expressed more in contact with laminin, followed by collagen IV, while CIG1 expression was higher in front of fibronectin. Enolase has been described as one of the Pb ligands; RDS1 may be related to stress conditions such as deprivation of nutrients, including iron and copper and CIG1 may be involved in iron retention at the cell surface and / or iron uptake by siderophores. The protein extracts were characterized by 2D-electrophoresis and, in general, it was observed from 164 to 242 proteins (spots) with pI ranging from 2.4 to 9.6 and molecular weight from 5 to 112 kDa when the fungi was depleted of Cu and a comparative analysis of proteomic profile demonstrated the existence of 118 similar proteins between Pb without Cu and Pb in contact with laminin, 140 between Pb without Cu and in contact with fibronectin, 220 between Pb without Cu and in contact with type I collagen and 158 between Pb without Cu in contact with type IV collagen. Also, it was observed 105, 127, 125 and 86 unique proteins among Pb without Cu and Pb without Cu in contact with laminin, fibronectin, collagen type I and collagen type IV, respectively. This study contributes to understanding how the fungus reacts against the depletion of copper and in conditions simulating the host.

## 1. Introdução

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica de grande importância no Brasil, país que possui a maior concentração de áreas endêmicas para essa doença no mundo e tem como agente etiológico o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. Este fungo, no indivíduo infectado ou quando cultivado a 37°C, apresenta-se na forma leveduriforme, já em temperatura ambiente, desenvolve-se sob a forma miceliar, sendo esta, a provável forma encontrada no ambiente (COUTINHO et al., 2002). A PCM foi descrita pela primeira vez, em 1908, por Adolfo Lutz. Quatro anos depois, Splendore descreveu novos casos e estudou minuciosamente a morfologia do fungo, denominando-o *Zymonema brasiliensis*. Posteriormente, em 1930, Floriano Paulo de Almeida instituiu a denominação *Paracoccidioides brasiliensis*. O termo paracoccidioidomicose foi instituído em 1971 na reunião de micologistas das Américas em Medellin e persiste, até hoje, como nomenclatura oficial (PALMEIRA et al, 2005).

O gênero *Paracoccidioides* provavelmente surgiu entre cinco e 23 milhões de anos durante o Mioceno. Sua evolução provavelmente ocorreu na América do Sul, alcançando posteriormente a América Central há cerca de cinco milhões de anos atrás, durante o Plioceno, com a ascensão do Istmo do Panamá unindo as Américas do Sul e Norte. Como ocorreu a chegada do fungo ao Norte ainda não é certo, porém estudos estão sendo feitos para tentar explicar, e uma das hipóteses seria o papel dos animais da ordem *Xenarthra*, carreando o fungo do Sul para o Norte. Esta relação vem sendo estudada, pois o fungo vem sendo isolado de tatus (principalmente *Dasypus novencintus*) jovens e adultos, ambos os sexos e sem nenhum sinal visível da paracoccidioidomicose. Porém, a presença de granuloma com elementos fúngicos compatíveis com *P. brasiliensis* é ocasionalmente observado em linfonodos, baço e pulmões de alguns animais indicando condição ativa da PCM (BAGAGLI et al., 2006).

A correta taxonomia molecular deste fungo tem aberto novas possibilidades para o estudo e o entendimento de suas relações ecoepidemiológicas com seus hospedeiros (BAGAGLI *et al.*, 2006). Com base em recentes análises filogenéticas, *P. brasiliensis* está classificado na Ordem Onygenales, na Família Ajellomycetaceae, formando um clado monofilético que inclui os gêneros *Blastomyces*, *Emmonsia* e *Histoplasma* (UNTEREINER *et al.*, 2004).

Matute *et al.* (2006) estudaram 65 isolados de *P. brasiliensis*, e classificou-os em três diferentes espécies filogenéticas, S1, PS2 e PS3 sendo a espécie S1, um grupo parafilético encontrado no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela, a espécie PS2, um grupo monofilético encontrado no Brasil e Venezuela e a espécie PS3, um grupo monofilético encontrado apenas na Colômbia. Carrero *et al.* (2008) estudaram 21 isolados de *P. brasiliensis*, incluindo sete novos isolados, com base na comparação de seqüências codantes e não codantes de diferentes genes, além das regiões ITS (seqüências espaçadoras internas). Estes foram classificados dentro de duas espécies filogenéticas, S1 e PS3, anteriormente descritas por Matute *et al.* (2006), além de classificar o isolado Pb01 separado dos demais, propondo a classificação deste como uma nova espécie filogenética. Teixeira *et al.* (2009) analisaram 88 isolados e identificaram 17 como pertencentes ao grupo Pb 01 e estimaram que as espécies filogenéticas S1/PS2/PS3 e Pb01 tiveram um ancestral comum a cerca de 32 milhões de anos, e através de análises de recombinação sugeriram a existência de isolamento reprodutivo entre estas espécies e por isso propõem os isolados Pb 01 como uma nova espécie, *Paracoccidioides lutzii*.

Fungos patogênicos como *P. brasiliensis* apresentam múltiplos fatores que podem causar danos ao hospedeiro e contribuir para o fenótipo de virulência. A aderência, a colonização e características do fungo que o levam a resistir aos

ambientes hostis do hospedeiro estão correlacionadas ao desenvolvimento da doença (MENDES-GIANNINI et al., 2005; FILLER & SHEPPARD, 2006). A capacidade de *P. brasiliensis* causar micose com grande variedade de manifestações clínicas depende provavelmente da relação entre a virulência do fungo, a habilidade deste em interagir com as estruturas do hospedeiro e invadi-las, e a resposta imunológica deste último (; MENDES-GIANNINI ET AL., 2000; MONTEIRO DA SILVA et al. 2005).

A interação fungo-hospedeiro é extremamente complexa e estudos moleculares associados a modelos de infecção *in vivo* são essenciais para identificar prováveis genes responsáveis pela manutenção e proliferação do agente no hospedeiro. Na PCM, os mecanismos envolvidos, desde o primeiro contato com o agente até os estágios subseqüentes da doença são pouco conhecidos. Sabe-se, no entanto, que um amplo espectro de apresentações clínicas pode ocorrer variando desde formas cutâneas a formas sistêmicas, podendo atingir vários tecidos, com ênfase no pulmão (FRANCO et al, 1994). A PCM é uma doença que pode afetar diferentes órgãos e, portanto, *P. brasiliensis* deve ter desenvolvido mecanismos que o capacitam a aderir, extravasar e invadir barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro (LENZI et al., 2000), sintetizando várias substâncias que participam direta ou indiretamente da relação parasito-hospedeiro.

*P. brasiliensis* é considerado um fungo intracelular facultativo, podendo aderir e invadir células epiteliais *in vivo* e *in vitro* (MENDES-GIANNINI et al., 2000). A endocitose deste fungo ativa os microfilamentos e microtubulos, além de induzir apoptose (MENDES-GIANNINI et al., 2004). Embora a invasão de células não fagocíticas seja de extrema importância na patogênese da doença, a descrição de adesinas, o conhecimento de genes e moléculas relacionados à adesão e invasão durante o processo infeccioso ainda é restrito (MENDES-GIANNINI et al., 2005).

O uso de moléculas de superfície envolve estratégias do microrganismo para evadir-se do sistema imune e para a sua própria sobrevivência nos sistemas do hospedeiro. A adesão está intimamente associada ao controle transcricional envolvendo várias vias regulatórias. Várias vias de sinalização foram descritas até hoje, inclusive Ras/cAMP/PKA e da MAP quinase (MAPK) em leveduras, que controlam a síntese destas moléculas que ativam a adesão em resposta, por exemplo, ao estresse e limitação de nutrientes (SAMPERMANS et al., 2005).

Em *P. brasiliensis*, algumas adesinas foram descritas, e acredita-se que tenham papel importante em sua patogênese (ANDREOTTI et al., 2005; BARBOSA et al., 2006; PEREIRA et al., 2007; GONZALEZ et al., 2005; VICENTINI et al., 2004; MENDES-GIANNINI et al., 2006; DONÓFRIO et al., 2009; NETO et al., 2009). Entretanto, até agora não dispomos de cepas mutantes para estes genes. Cepas mutantes foram descritas em *Candida albicans* (SUNDSTROM et al., 2002; ZHAO et al., 2004), *C. glabrata* (CORMACK et al., 1999), *Blastomyces dermatitidis* (BRANDHORST et al., 2003) e *Coccidioides immitis* (HUNG et al., 2002), e foi confirmado que adesinas tem papel como fatores de virulência. *C. albicans* geneticamente modificada para as adesinas Hwp1, Ala1p/Als5p e Als1p foi incapaz de aderir a células epiteliais e endoteliais (SUNDSTROM et al., 1999; 2002); igualmente, *B. dermatitidis* modificado para sua principal adesina, WI-1, foi incapaz de se ligar aos tecidos pulmonares (BRANDHORST et al., 1999).

Os avanços na caracterização de adesinas de *P. brasiliensis* têm sido obtidos com os estudos de transcriptoma (FELIPE et al., 2003; FELIPE et al., 2005; NUNES et al., 2005). Castro et al., 2005 realizaram um *screening* das proteínas GPI ancoradoras deste fungo, entre estas há adesinas ligantes da matriz extracelular. Da mesma forma, Tomazett et al., 2005 estudaram genes codificantes para enzimas possivelmente

envolvidas na biossíntese e remodelagem de polissacarídeos da parede celular, que tem potencial de influenciar na adesão a células do hospedeiro.

Uma das estratégias possivelmente utilizadas pelo patógeno e depreendidas a partir de análises de redundância de ESTs no processo infeccioso (BAILÃO *et al.*, 2006; 2007; BASTOS *et al.*, COSTA *et al.*, 2007), seria a expressão de genes relacionados as adaptações que ocorrem durante o contato do fungo com o hospedeiro, que pode também estar relacionado à captação de micronutrientes. Estas condições podem influenciar no padrão de adesinas, conforme demonstrado recentemente, quando o isolado de *P.brasiliensis* 18 expressou número maior de proteínas com características de adesinas após reisolamento de animais, de culturas de células epiteliais, ou na presença de sangue (ANDREOTTI *et al.*, 2005; FÁTIMA DA SILVA, *et al.*, 2007; DONOFRIO, 2009).

Uma característica vital dos microrganismos é a sua capacidade de adaptação às alterações do ambiente em que se encontra o que envolve a regulação da expressão gênica em resposta aos diferentes sinais ambientais (KATO-MAEDA *et al.*, 2001). Embora a função gênica seja governada pelo seu produto final, a proteína, várias observações relatam que a quantidade de proteína produzida depende diretamente da quantidade de RNA mensageiro (RNAm) que a codifica. Isso significa que a compreensão, das funções celulares sob determinadas condições, pode ser obtida por meio da quantificação dos RNAs mensageiros presentes naquele momento (YAMAMOTO *et al.*, 2001).

Ultimamente, muitas técnicas estão sendo desenvolvidas para identificar a expressão diferencial de um gene. Uma destas técnicas é o RDA (*Representational Difference Analysis*), que em sua forma original foi designado para identificar diferenças entre populações de DNA genômico (LISITSYN *et al.*, 1993). Esta metodologia foi



subseqüentemente modificada para permitir a análise de populações de RNAm (PASTORIAN et al., 2000), sendo uma técnica poderosa e sensível para identificação de genes expressos diferencialmente (HUBANK & SCHATZ, 1994), e permite o isolamento de seqüências mais e menos expressas em duas populações diferentes de cDNA (DNA complementar).

Esta técnica permite a detecção de mudanças na expressão de RNAm por enriquecimento seletivo sem qualquer conhecimento prévio do gene em questão. A metodologia de RDA baseia-se em hibridização subtrativa e enriquecimento cinético, purificando transcritos presentes em uma população e ausentes em outra (LYSITIN et al., 1993; PASTORIAN et al., 2000).

Embora freqüentemente aplicada em eucariotos superiores, esta metodologia foi pouco aplicada em fungos de interesse médico. Recentemente, Bailão et al., (2006) aplicaram-na para avaliar genes diferencialmente expressos por *P. brasiliensis*, através da infecção em animais e contato com sangue humano. Diferentes transcritos foram identificados em ambas as situações, entre eles, genes relacionados à defesa celular, aquisição de ferro e cobre, síntese e remodelagem da parede celular, os quais podem ter importantes implicações no processo de infecção deste patógeno.

Para que ocorra uma colonização bem sucedida do hospedeiro os microrganismos devem inicialmente aderir a tecidos alvos e concomitantemente obter nutrientes essenciais para o seu crescimento. Ferro e cobre são requeridos para a sobrevivência dos organismos, primariamente devido ao seu papel como cofatores em funções metabólicas essenciais e ao mesmo tempo a sua reatividade com peróxido de hidrogênio resulta na formação de radicais hidroxilas, altamente tóxicos, o que determina o requerimento de mecanismos que regulam a captação e estocagem desses nutrientes. Normalmente, não existe ferro livre nos tecidos do hospedeiro

(RATLEDGE & DOVER, 2000). De forma similar, o metal cobre é requerido para crescimento de microrganismos, ao mesmo tempo em que é altamente seqüestrado por tampões e proteínas no hospedeiro mamífero (RESS & THIELE, 2004). Adicionalmente, cobre é particularmente importante durante a infecção, visto que a homeostase de cobre também afeta a de ferro, dado o requerimento de cobre na captação de ferro (DAVIS-KAPLAN et al., 1998; MARVIN et al., 2004). Durante a infecção o nível de ferro disponível é significativamente reduzido e a aquisição do composto torna-se um processo altamente adaptativo e importante para virulência, como demonstrado em vários organismos. O excesso de ferro promove a exacerbação de meningite em um modelo animal de infecção cerebral por *Cryptococcus neoformans* (BARLUZZI et al., 2002). Mutantes do gene codificante para ferro oxidase (contendo cobre) e relacionada à captação de ferro em *Candida albicans*, são menos letais do que o tipo selvagem em camundongos (RAMANAN & WANG, 2000). Em *C. albicans* a expressão aumentada de transcritos por privação de ferro inclui uma variedade de genes, desde aqueles relacionados a propriedades da parede celular aos relacionados com atributos de virulência, como os genes codificantes para hidrolases secretadas (YU LAN et al., 2004). A colonização do estômago por *Helicobacter pylori* requer expressão de um regulador de captação de ferro, o qual promove a expressão de vários genes em condições de privação de ferro. Mutantes para esse gene (Fur) são menos hábeis em colonizar o hospedeiro em comparação ao selvagem (GANCZ ET AL., 2006). O fator de transcrição (Cir 1) ferro-dependente de *C. neoformans* controla a regulação de vários genes para aquisição de ferro, bem como controla a expressão de fatores de virulência como a produção de cápsula e de melanina (JUNG ET AL., 2006). De forma similar, a disponibilidade de cobre em tecidos do hospedeiro é limitante para fungos durante o processo infeccioso. Foi demonstrado que a expressão aumentada de

transportador de cobre em *C. neoformans* correlaciona-se com a sua disseminação para as meninges em pacientes (WATERMAN *ET AL.*, 2007). Poucas informações existem sobre mudanças na expressão de genes de *P. brasiliensis* durante o processo de infecção. Estudos como os de Bailão *et al.*, 2006; 2007; Bastos *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2007 revelaram algumas estratégias de *P. brasiliensis* para adaptação a condições do hospedeiro durante o processo infeccioso. Uma delas possivelmente utilizada pelo patógeno e depreendida a partir de análises de redundância de ESTs no processo infeccioso, seria a expressão de genes relacionados à captação de micronutrientes.

Entender a resposta adaptativa em diferentes condições de crescimento, entender os processos de adesão e invasão celular, bem como identificar genes diferencialmente expressos durante a interação fungo-hospedeiro, pode ajudar a elucidar os mecanismos utilizados para a sobrevivência e crescimento de *P. brasiliensis* nos diversos tecidos dos seres humanos.

## 2. Justificativa

Este trabalho propôs uma análise de transcritos expressos na condição de depleção de cobre frente aos componentes da MEC, mimetizando as condições de infecção pelo fungo *P. brasiliensis*. A disponibilidade de cobre em tecidos é mantida em níveis baixos de forma a restringir o crescimento de patógenos. A disponibilidade de micronutrientes livres no hospedeiro é mantida abaixo da quantidade requerida para o desenvolvimento desses organismos, assim, a sua habilidade na obtenção desses micronutrientes define, em grande parte, a virulência do microrganismo. A influência deste micronutriente no padrão de adesão neste fungo é pouco conhecida. Nesse contexto, sabe-se que dependendo das condições, *P. brasiliensis* perde a capacidade de aderir às células epiteliais pulmonares. Nesse estudo pretendeu-se examinar as respostas de *P. brasiliensis* quanto às características de adesão aos componentes da matriz extracelular na vigência de privação por cobre com o objetivo de obter melhores informações sobre a patogenicidade. Nossa expectativa é que a análise genômica possibilite a definição de moléculas de diferentes classes que possam ajudar a explicar a influência do cobre no processo de adesão do fungo em estudo.

### 3. Objetivos

Neste trabalho pretendeu-se identificar genes e proteínas diferencialmente expressos em *P. brasiliensis*, cultivado em condições de deficiência de Cobre, relacionados à adesão *in vitro* na presença dos componentes da Matriz Extracelular (MEC), Laminina, Fibronectina, Colágeno tipo I e tipo IV.

#### 3.1. Estratégias Experimentais

- Submeter as formas leveduriformes cultivadas na ausência de cobre à adesão *in vitro* na presença dos componentes da MEC – Laminina, Fibronectina, Colágeno tipo I e tipo IV;
- Caracterizar transcritos diferencialmente expressos durante o contato de *P. brasiliensis*, quando depletado de cobre, com os diferentes componentes da MEC através da técnica de RDA;
- Realizar análise diferencial do perfil protéico de *P. brasiliensis* quando depletado de cobre frente aos componentes da MEC - Laminina, Fibronectina, Colágeno tipo I e tipo IV.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Preparo dos meios de cultura para cultivo de *P. brasiliensis*

Foi utilizado o meio quimicamente definidamente conhecido como MVM (McVEIGH & MORTON, 1965, modificado por RESTREPO e JIMENEZ, 1980) contendo: glicose 1%, fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{SO}_4$ ) 11 mM, sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ) 2 mM, cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 1 mM, sulfato de amônio ( $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ) 15 mM, L-asparagina 0,02%, L-cistina 0,002%, solução de vitaminas 1% e solução de elementos traços 0,1%.

A Solução de vitaminas consiste de cloridrato de timina 0,6 mg, niacina 0,6 mg, pantotenato de cálcio 0,6 mg, inositol 0,1 mg, biotina 0,01 mg, riboflavina 0,1 mg, ácido fólico 1 mg, cloreto de colina 1 mg, cloridrato de piridoxina 1 mg,  $\text{H}_2\text{O}$  quantidade para 10 mL de solução e a Solução de elementos de traços de ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) 900  $\mu\text{M}$ , sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) 600  $\mu\text{M}$ , sulfato ferroso amoniacal ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ) 4 mM, sulfato de manganês ( $\text{MnSO}_4$ ) 200  $\mu\text{M}$ , molibdato de amônia ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ ) 29  $\mu\text{M}$ , sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4$ ) 2,75 mM.

O meio então sofreu modificações para se adequar à situação de depleção de cobre: MVM (Controle); MVM sem sulfato de cobre. Além da retirada do metal do meio, para garantir a ausência desse íon foi utilizado, de acordo com a necessidade, o agente quelante batocuproinadisulfonato sódico (BCS) 50  $\mu\text{M}$ .

### 4.2. Microrganismo

Foi utilizado o isolado *Pb* 01 de *P. brasiliensis*, que foi colocado em contato com meio quimicamente definido como no item 4.1. por 03 horas, mantido a 37°C sob agitação.

### **4.3. Ensaio de Adesão de *P. brasiliensis* à componentes da MEC**

#### **4.3.1. Sensibilização de placas com componentes da MEC**

As placas de 24 poços Corning<sup>R</sup> foram sensibilizadas com os componentes da MEC, Laminina, Fibronectina, Colágeno tipo I e Colágeno tipo IV (SIGMA) com concentração de 50 ug/mL por 18 horas a 4°C e 1 hora a temperatura ambiente. Após o período de sensibilização as placas foram então lavadas 3 vezes com solução fisiológica tamponada com fosfatos (PBS) 0,05 M, pH 7,2.

#### **4.3.2. Adesão de *P. brasiliensis* a componentes da MEC**

Após o contato de 03 horas do fungo com o meio MVM depletado de cobre, seguiu-se a remoção das células do meio e a suspensão em PBS foi feita e essa suspensão foi ajustada em  $10^6$  cels/mL através de leitura em espectrofotômetro (DO=0,5 a 550nm). A seguir, 500 µL desta suspensão foi inoculada na placa já sensibilizada com os componentes da MEC, descrito anteriormente. Estas infecções foram incubadas a 37° C por 2 horas. Após este tempo, o sobrenadante foi retirado e a placa foi lavada três vezes com PBS e depois a cada poço foram adicionados 300 µL de tripsina para retirar o Pb aderido à placa. As suspensões de tripsina foram então recolhidas em eppendorfs e centrifugadas a 2500 RPM à 4°C. O sobrenadante foi então descartado e a cada eppendorf foi adicionado 500 µL de FACSFlow para posterior contagem de células através de citometria de fluxo (BD FACSCanto), com o auxílio do software BDFACS Diva. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

#### **4.4. Análise de expressão diferencial de genes**

##### **4.4.1. Extração de RNA total e síntese de cDNA**

As células fúngicas foram maceradas com nitrogênio líquido e rapidamente transferidas para um tubo (tipo Falcon) contendo 3,5mL de Trizol e pérolas de vidro. A amostra foi agitada vigorosamente em vórtex por 15 minutos e após, centrifugadas a 1620 x g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, adicionado de 0,2 mL de clorofórmio para cada 0,75mL de trizol recuperado, agitado vigorosamente e deixado em repouso por 10 minutos. Após o repouso, a amostra foi centrifugada a 1620 x g por 15 minutos e a fase aquosa, transferida para um novo tubo. Foi acrescentada 0,25 mL de isopropanol e 0,25mL de solução de citrato de sódio 0,4 M e cloreto de sódio 0,8M para cada 0,75mL de trizol recuperado inicialmente, agitado gentilmente e deixado em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 1620 x g por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, lavado com etanol a 75%. Nova centrifugação foi realizada a 1620 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente. Finalmente, o precipitado foi ressuspensão em 30µL de água DEPC (Diethyl Pirocarbonato) 0.01% e armazenado a -70 °C.

##### **4.4.2. Metodologia de RDA (*Representational Difference Analysis*)**

Foi seguido o protocolo descrito por Pastorian et al., (2000) modificado por Dutra et al., (2004).

###### **4.4.2.1. Síntese de cDNA fita simples**

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita em uma reação contendo 1µg de RNA total, 10pmol/µL da seqüência iniciadora (5'-



AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3') e essa mistura foi aquecida por 2 minutos a 72°C. Em seguida foi acrescentado 10pmol/μL do oligo dT modificado (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT<sub>(30)</sub>N<sub>1</sub>N, onde N=A, C, G ou T; N<sub>1</sub>=A, G ou C), 2μL de uma mistura de dNTPs (10 mM), 2μL de RNaseOUT (40U/μL) (Invitrogen), 0,4μL de DTT (100mM), 1,2μL de cloreto de magnésio (50mM), 2μL da enzima transcriptase reversa (200U/μL) (RT Superscript II - Invitrogen) e 4μL de tampão 5X (Tris-HCl 250mM pH 8,3; KCl 375mM; MgCl<sub>2</sub> 15mM). Esta reação foi incubada a 42°C durante 1 hora e trinta minutos. Após este período foi adicionado 80μL de TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM pH 8,0) e aquecida por mais 7 minutos a 72°C.

#### 4.4.2.2. Síntese de cDNA fita dupla

Para síntese da segunda fita de cDNA foi utilizado 3μL da primeira fita, 10pmol/μL da seqüência iniciadora (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'), 10μL de tampão 10X (Tris-SO<sub>4</sub> 600mM pH 8,9, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 180mM), 2μL de uma mistura de dNTPs (10mM), 2μL de sulfato de magnésio (50mM), 2μL de *Taq* Hi-Fi (Invitrogen) e água milli-Q estéril tratada com DEPC 0,01% para volume final de 100μL. As condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo inicial por 1 minuto a 95°C, seguido por 20 ciclos de desnaturação por 15 segundos a 95°C, anelamento por 30 segundos a 55°C, e extensão por 5 minutos a 68°C e um ciclo final de extensão por 7 minutos a 68°C.

#### 4.4.2.3. Digestão com *Sau3AI*

Cerca de 1μg da fita dupla de cDNA de ambos *tester* e *driver* foi digerida com 1μL da enzima *Sau3AI* (10U/μL) (Promega), 5μL de tampão B (Tris-HCl 60mM pH 7,5; NaCl 500mM; MgCl<sub>2</sub> 60mM; DTT 10mM), e água milli-Q estéril para volume final de

50µL durante 3 horas e trinta minutos a 37°C. Posteriormente, a reação foi purificada através do kit QIAquik (Qiagen) e quantificados a 260nm.

#### **4.4.2.4. Anelamento do primeiro par de adaptadores**

Os produtos da digestão das amostras *tester* e *driver* (300ng) foram ligados ao primeiro par de adaptadores RBam12 (5'-GATCCGTTTCATG-3') e RBam24 (5'-ACCGACGTCGACTATCCATGAACG-3') (500pmol/µL), nas seguintes condições: 55°C/20 minutos; 54°C/10 minutos; 53°C/1 minuto; 52°C/1 minuto; 50°C/1 minuto; 45°C/5 minutos; 40°C/5 minutos; 30°C/5 minutos; 25°C/5 minutos; 20°C/3 minutos; 15°C/5 minutos; 10°C/5 minutos; 4°C/30 minutos.

#### **4.4.2.5. Ligação do primeiro par de adaptadores**

Após anelamento foi adicionado 1µL de ligase (5U/µL) (Fermentas), 3µL de tampão ligação 10X (Tris-HCl 400mM; MgCl<sub>2</sub> 100mM; DTT 100mM; ATP 5mM) e 3µL de ATP (10 mM) (Invitrogen), por 18 horas a 16°C em seguida a reação foi purificada através do kit QIAquik (Qiagen).

#### **4.4.2.6. Teste de ligação do primeiro par de adaptadores**

Para confirmar a ligação dos adaptadores, foi feito o teste utilizando-se: 0,5µL da reação de ligação, 5µL de uma mistura de dNTPs (1mM), 2,5µL de tampão 10X (Tris-SO<sub>4</sub> 600mM pH 8,9; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 180mM), 2µL de cloreto de magnésio (50mM), 0,5µL de *Taq* Hi-Fi (Invitrogen) e água milli-Q estéril para volume final de 25µL, nas seguintes condições: um ciclo inicial por 1 minuto/95°C, seguido por 25 ciclos de desnaturação por 45 segundos/95°C e extensão por 4 minutos/72°C e um ciclo final por 10 minutos/72°C.

A reação foi visualizada em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X, corado pelo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e observado à luz ultra-violeta.

#### 4.4.2.7. Primeira subtração

Para primeira subtração, o *tester* (cDNA digerido e ligado aos adaptadores) e o *driver* (cDNA digerido sem os adaptadores) foram misturados na proporção de 1:10, acrescido de 50µL de acetato de amônio 7,5M e 375µL de etanol absoluto, a reação foi incubada por 3 horas à -20°C. Posteriormente, esta foi centrifugada a 20800 x g por 30 minutos e lavada com etanol 70%. O *pellet* foi ressuspendido em 4µL de tampão EE 3X (EPPS 30 mM (Sigma) pH 8,0; EDTA 3 mM), aquecido por 95°C/2 minutos. Em seguida, esta foi transferida para um tubo contendo 1,5µL de NaCl 5M, coberta com óleo mineral e incubada nas seguintes condições: 95°C/3 minutos; 67°C/24 horas. Após este período foi adicionado 40µL de água milli-Q estéril.

#### 4.4.2.8. Amplificação dos produtos diferenciais da primeira subtração

Os produtos diferenciais da subtração foram enriquecidos através de uma reação contendo 10,4 µL de tampão 10X (Tris-SO<sub>4</sub> 600 mM pH 8,9; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 180 mM), 8,3 µL de cloreto de magnésio (50 mM), 5,2 µL de uma mistura de dNTPs e água milli-Q estéril para volume final de 93,4 µL. Foram retirados 10 µL desta reação e adicionado 0,5 µL de *Taq* Hi-Fi (Invitrogen) e reservado, ao restante foram adicionados 0,1 µL da seqüência iniciadora RBam24 e 6 µL da subtração, esta foi aquecida durante 2 minutos a 72°C, em seguida foi adicionado o restante da reação e aquecido por mais 5 minutos a 72°C, seguido de: 1 ciclo inicial de 1min/95°C, seguido por 7 ciclos de 45seg/95°C; 4min/72°C e um ciclo final de 10min/72°C. Posteriormente uma nova PCR foi feita, em que 6 µL da primeira foram utilizados como molde para uma segunda

reação realizada nas mesmas condições da anterior, entretanto esta foi amplificada 30 vezes. Como controle negativo, a mesma mistura foi utilizada, exceto com o produto de ligação. A reação foi aplicada em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X, corado pelo brometo de etídio e observado à luz ultravioleta. O produto final foi purificado e digerido com a enzima de restrição *Sau3AI* para remoção dos adaptadores e uma nova purificação foi feita.

#### **4.4.2.9. Segunda amplificação**

A segunda amplificação foi feita usando-se os adaptadores NBam12 (5'-GATCCTCCCTCG-3') e NBam24 (5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG-3') que foram anelados e ligados aos produtos da primeira amplificação, nas mesmas condições da primeira reação de anelamento e ligação (itens 4.4.2.4 e 4.4.2.5), esta foi purificada novamente antes da segunda subtração. A segunda subtração foi realizada de acordo com o item 4.4.2.7, entretanto na proporção de 1:100 de *tester* (produtos da segunda ligação) e *driver*. A amplificação foi feita através da seqüência NBam24, seguindo-se o protocolo descrito anteriormente. Os produtos foram purificados e verificados em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X, corado pelo brometo de etídio, observado à luz ultra-violeta em seguida foi feita a clonagem.

#### **4.4.3. Ligação dos fragmentos em vetor de clonagem**

Os fragmentos de interesse foram ligados ao vetor de clonagem pGEM-TEasy (Promega), na proporção de 1:5 (vetor/inserto). A reação de ligação foi efetuada em 1 µL de tampão ligase (1X), 1 µL de T4 DNA ligase, 1 µL de ATP num volume final de 10 µL. Após incubação a 16°C/18h, esta foi precipitada e a transformação foi realizada em células de *Escherichia coli* XL1 *blue* (Stratagene).

#### 4.4.4. Preparo de células competentes para transformação por eletroporação

Uma colônia de *E. coli* XL1 *blue* (Stratagene) foi inoculada em 10 mL de meio LB (Luria-Bertani) líquido por 18 horas a 37°C. Em seguida, foram inoculados 5 mL deste pré-inóculo em 500 mL de meio LB, incubado a 37°C sob agitação até atingir uma D.O de 0,35-0,4 em comprimento de onda de 550 nm. A cultura foi então resfriada em banho de gelo por 30 minutos e centrifugada a 3.000 *g* por 15 minutos a 4°C. As células foram ressuspendidas em 450 mL de água milli-Q estéril gelada, centrifugadas a 3.000 *g* por 15 minutos a 4°C e adicionado 200 mL de água gelada e submetidas a uma nova centrifugação. Em seguida foram adicionados 10 mL de glicerol 10% gelado às células, seguindo-se nova centrifugação. O centrifugado foi ressuspendido em aproximadamente 2 mL de glicerol 10% ( $3 \times 10^{10}$  céls./mL), em seguida estas foram aliqüotadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C.

#### 4.4.5. Transformação de células de *E. coli* por eletroporação

Uma aliqüota de 20 µL de células competentes foi descongelada em banho de gelo e recebeu a adição de 2 µL do sistema de ligação (item 4.4.3). Esta mistura foi então colocada em uma cubeta de 0,2 cm previamente gelada. A cubeta foi colocada no aparelho *Cell Porator E. coli Pulser* (Gibco) programado com os seguintes parâmetros: 2,5 mV e 125 Ω. Após o pulso as células foram recolhidas com 1 mL de meio SOC (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) e incubadas por 1 hora a 37°C. A suspensão foi plaqueada em ágar LB acrescido de 100 µg/mL de ampicilina, IPTG (isopropil-tio-β-D-galactopiranosídeo) e X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactopiranosídeo), nas concentrações de 0,1 mM e 30 µg/mL, respectivamente, e incubada por 18 horas a 37°C para a seleção de clones recombinantes.

#### 4.4.6. Extração de DNA plasmidial em microplaca

As colônias positivas foram crescidas em 1 mL de meio *Circle Grow* (Bio 101 Systems) contendo 50 µg/mL de ampicilina em microplacas com 96 poços, por 22 horas, 50 g a 37°C. Após este período 100 µL dos clones cultivados foram transferidos para placas tipo ELISA, adicionado v/v de glicerol 50% e estocadas a -80°C. O restante do crescimento foi centrifugado a 2.000 g por 6 minutos, o sobrenadante foi descartado e 240 µL de solução GTE (glicose 50 mM; Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0) foram adicionados a cada poço. A microplaca foi submetida à agitação em vortex e novamente centrifugada 2.000 g por 9 minutos. O sobrenadante foi descartado e 80 µL de solução GTE foram adicionados a cada poço. Após agitação em vortex as suspensões foram transferidas para uma placa de 96 poços (fundo redondo) contendo 2 µL de RNase (10 mg/mL). Em seguida, 80 µL de NaOH 0,2 N; SDS 1% foram adicionados a cada poço, a placa foi homogeneizada por inversão e mantida à temperatura ambiente por 10 minutos, seguindo-se adição de 80 µL de acetato de potássio 3 M. Após homogeneização por inversão, a reação foi mantida à temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse período, as placas foram incubadas a 90°C por 30 minutos e em seguida resfriadas em banho de gelo e centrifugada a 2.000 g por 9 minutos. A reação foi transferida para um sistema contendo uma placa Millipore (MAGV N22) no topo de uma placa de 96 poços(fundo cônico), o qual foi centrifugado a 2.000 g por 6 minutos. O sistema foi desmontado, e a etapa seguinte consistiu na precipitação do DNA. Para tanto, 100 µL de isopropanol foram adicionados ao filtrado, em seguida a placa foi centrifugada a 2.000 g por 45 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em água milli-Q estéril.

#### 4.4.7. Seqüenciamento

O seqüenciamento foi realizado pelo método de Sanger et al., (1.977) utilizando o seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences), as reações foram realizadas no Laboratório de Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências do Instituto de Medicina Tropical II da Faculdade de Medicina - USP. Foram utilizados os kits *DYEnamic ET* e *Dye Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences), seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante, utilizando o oligonucleotídeo T7 *forward promoter* em que se utilizou um ciclo inicial por 2seg/95°C seguido de 34 ciclos a 10seg/ 95°C, 15seg /50°C, 1min/60°C. A seqüência nucleotídica foi determinada através da incorporação de dideoxynucleotídeos (ddNTP) terminadores e foram analisadas e avaliadas automaticamente através dos cromatogramas gerados e interpretados pelo *software MegaBACE 1000 sequencer* convertidos em seqüência de DNA.

#### 4.4.8. Análise das seqüências

Inicialmente, as ESTs foram processadas utilizando o programa Phred (EWING et al., 1998). Somente as seqüências com mais de 100 nucleotídeos e com qualidade Phred maior ou igual a 20 foram selecionadas. A retirada de seqüências contaminantes de vetor foi realizada, utilizando-se o programa Crossmatch (GREEN, 1996) e para a montagem dos *contigs* foi utilizado o programa CAP3 (HUANG & MADAN, 1999). Finalmente, as ESTs resultantes foram comparadas com os banco de dados não redundante genBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) utilizando-se o programa BLASTx (ALTSCHUL, et al., 1997). A classificação das proteínas encontradas referente à sua função biológica foi feita através do programa Gene Ontology ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)).

#### 4.4.9. Validação dos resultados por RT-PCR e PCR em Tempo Real (Real Time PCR)

Para a validação dos resultados do RDA foram utilizadas duas metodologias: RT-PCR e Real Time PCR. Para tanto foi utilizado o mesmo RNA usado para o RDA e a síntese da primeira fita foi realizada conforme o item 4.4.2.1. Iniciadores para o gene da proteína ribossomal L34 (F 5'CAAGACTCCAGGCGGCAAC3' e R 5'GCACCGCCATGACTGACG3') de *P. brasiliensis* foram utilizados como controle da reações.

Para a validação dos resultados por RT-PCR, foram desenhados oligonucleotídeos específicos para as ESTs que apresentaram maior redundância: enolase (127pb, F 5'CCTGCTCCTCAAAGTCAACC3' e R 5'GATGGTGACATCCTCCGTCT3'), Glicoproteína induzida por Citocina (177pb 5'TTGGTCGTGAATTTTGGTGA3' e 5'ATGGGCTTATCACGTCCAAC3') e RDS (297pb 5'ACGGCAATGTGTTCTGAGTG3' e 5'AAGAATTCGGGGCCATAATC3'). As reações foram realizadas utilizando-se concentrações de 25pmol de cada oligonucleotídeo e cDNA num tubo contendo PCR Master Mix (2x) (Fermentas), mistura pronta para PCR que contém Taq DNA Polymerase, PCR Buffer, MgCl<sub>2</sub> e dNTPS. O volume final na reação de amplificação foi de 25µL sendo utilizada água Milli-Q estéril. As reações de amplificação foram realizadas com temperatura inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos com temperatura de desnaturação de 95°C por 30 segundos; a temperatura de anelamento foi ajustada de acordo com os iniciadores variando de 50 a 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e um ciclo final a 72°C por cinco minutos, utilizando-se aparelho termociclador Perkin Elmer modelo *GeneAmp PCR System 9700*. O produto amplificado foi separado em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 1X, corados com GelRed (Biotium) e observados à luz ultra-violeta.



Para a validação dos resultados por PCR em Tempo Real (Real Time PCR), foram utilizados iniciadores específicos para duas das ESTs já avaliadas por RT-PCR: enolase e Glicoproteína induzida por Citocina (177pb 5'TTGGTCGTGAATTTTGGTGA3' e 5'ATGGGCTTATCACGTCCAAC3'). As reações foram realizadas utilizando-se as quantidades necessárias de cDNA, 12,5 µL de SYBR green ROX mixture (Applied Biosystems), e 25pmol de cada primer, sendo adicionado a reação água até atingir o volume de 25 µL. As reações foram realizadas com temperatura inicial de 50°C por 2 minutos, seguido por 10 minutos a 95°C. Depois, 40 ciclos de 95°C a 15 segundos, seguidos de anelamento e síntese a 60°C por um minuto. Em seguida a PCR a análise da curva de melting foi realizada em que foi confirmado a emissão de sinal correspondente a um único produto. As reações foram realizadas em triplicata com o aparelho Applied Biosystems 7500 cycler. Os dados foram analisados pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Os valores obtidos para as amostras em duplicata foi calculado a média e então o valor  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (L34 foi utilizado como referência) em seguida os valores para as amostras foi normalizado a partir da amostra de RNA somente depletado de cobre. Como controle negativo utilizado continha todos os reagentes exceto a amostra de cDNA. Depois de 40 ciclos de amplificação, nenhum produto de amplificação foi detectado para o controle negativo.

#### **4.5. Análise de expressão diferencial de proteínas**

##### **4.5.1. Preparo dos extratos protéicos de *P. brasiliensis***

O cultivo de *P. brasiliensis* foi centrifugado e lavado de 3 a 5 vezes com água gelada para a retirada do meio de cultura. O *pellet* foi acrescido de solução 10mM Tris – HCl e um mix de inibidores de proteases (1mg/mL de pepstatina, leupeptina, antipain, aprotinina e chymostatin) e 100mM de PMSF, depois disso foi macerado com

nitrogênio líquido, estes macerados foram recolhidos acrescidos de pérolas de vidro e levados ao vórtex por 30 minutos, a seguir foram centrifugados por 45 minutos 13.000 x g e o sobrenadante foi recolhido. A concentração protéica dos extratos foi quantificada pelo método de Bradford (BioRad) e em seguida as amostras foram avaliadas por SDS-PAGE.

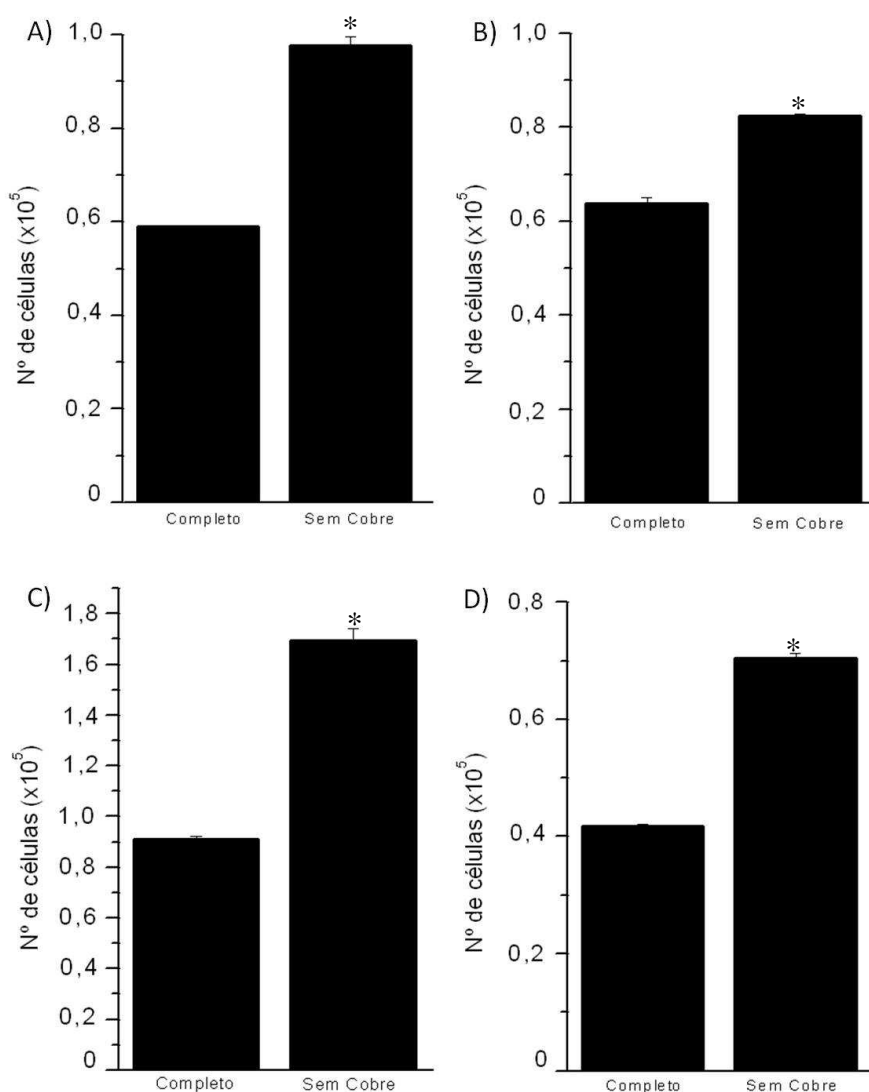
#### **4.5.2. Análise protéica por Eletroforese Bidimensional**

Os componentes protéicos dos extratos foram primeiramente submetidos à focalização isoeétrica, utilizando Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). A segunda dimensão, realizada para a separação das proteínas de acordo com a massa molecular, foi realizada em gel de poliacrilamida 12.5% de acordo com Laemmli (1970). Os géis foram corados com Coomassie Azul Brilhante G-250 segundo Neuhoff et al. (1988). A análise dos dados foi realizada com auxílio do programa 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare).

## 5. Resultados

### 5.1. Adesão de *P. brasiliensis* aos componentes da MEC

Os ensaios de adesão de *P. brasiliensis* aos componentes da MEC foram realizados com o isolado Pb01 em meio quimicamente definido em duas condições (Completo e depletado de Cu) por três horas. Após o período de depleção, o fungo foi colocado em contato com os componentes da MEC (Colágeno tipo I, Colágeno Tipo IV, Laminina e Fibronectina) e a seguir as células foram removidas e contadas em Citometro de Fluxo. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata e avaliados estatisticamente.



**Figura 1.** Gráficos representativos da adesão de *P. brasiliensis* a Laminina (A), Fibronectina (B), Colágeno tipo I (C) e Colágeno tipo IV (D), em diferentes condições de cultivo do fungo. \* p ≤ 0,05

A situação onde houve a depleção de Cu apresentou significativo aumento da adesão frente a todos os componentes da MEC (Laminina:  $p = 0,00717$ ; Fibronectina:  $p = 0,00164$ ; Colágeno tipo I:  $p = 0,002245$ ; Colágeno tipo IV:  $p = 0,00015$ ).

## 5.2. Análise de genes diferencialmente expressos por *P. brasiliensis* após depleção de Cobre frente aos componentes da MEC

### 5.2.1. Extração de RNA total de *P. brasiliensis* depletado de Cobre

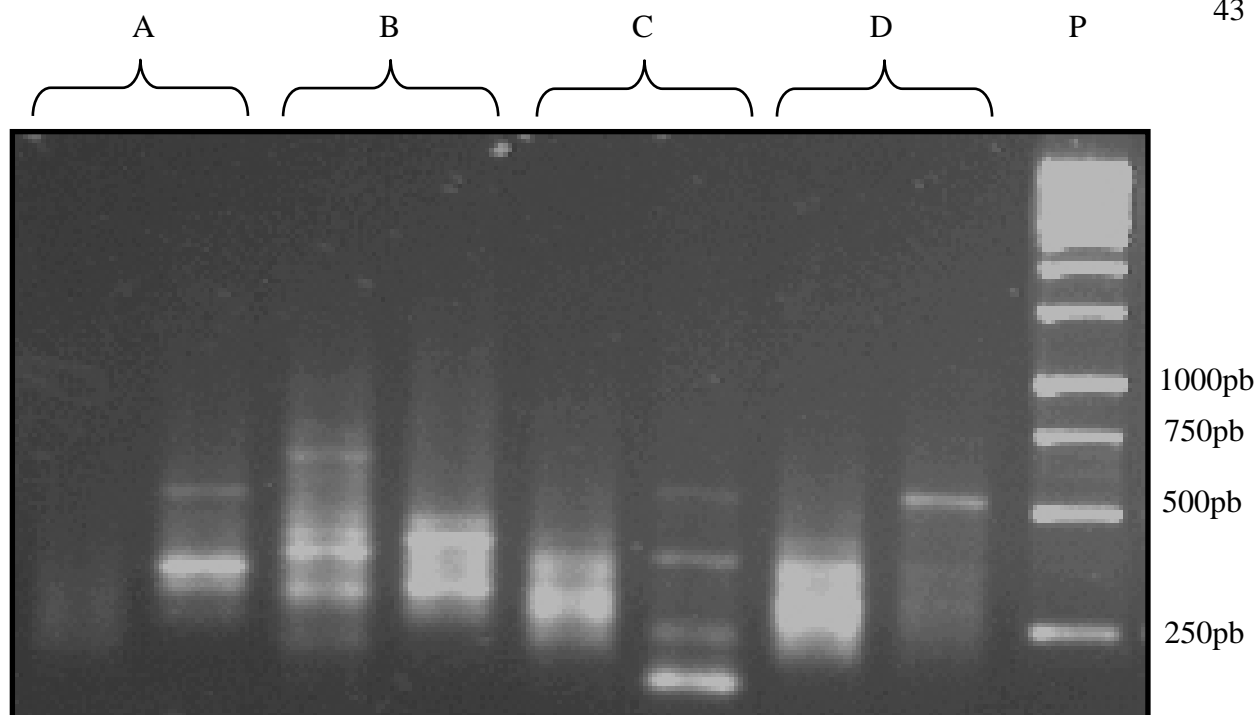
A extração de RNA foi realizada em cinco condições de cultivo, conforme descrito na tabela 1 e a partir destas extrações passou-se ao ensaio de RDA.

**Tabela 1.** Situações analisadas pelo ensaio de RDA

<b><i>Driver</i></b>	<b><i>Tester</i></b>
<i>P. brasiliensis</i> mantido em MVM sem Cobre	<i>P. brasiliensis</i> mantido em MVM sem Cobre frente à Laminina
<i>P. brasiliensis</i> mantido em MVM sem Cobre	<i>P. brasiliensis</i> mantido em MVM sem Cobre frente à Fibronectina
<i>P. brasiliensis</i> mantido em MVM sem Cobre	<i>P. brasiliensis</i> mantido em MVM sem Cobre frente à Colágeno tipo I
<i>P. brasiliensis</i> mantido em MVM sem Cobre	<i>P. brasiliensis</i> mantido em MVM sem Cobre frente à Colágeno tipo IV

### 5.2.2. Ensaio de RDA

Para cada situação foram realizadas duas hibridizações subtrativas nas proporções de 1:10 e 1:100 de *tester* e *driver* respectivamente (figura 1), com excesso de *driver* para remoção das seqüências idênticas nas duas condições. Os produtos diferencialmente expressos das duas situações foram amplificados, resultando em padrões distintos.



**Figura 2.** Produtos diferencialmente expressos de *P. brasiliensis* após depleção de cobre frente aos componentes da MEC. P, Marcador de tamanho molecular de 1Kb (Fermentas); A, Produtos diferencialmente expressos (PDE) Situação Pb sem cobre frente a Laminina, 1ª subtração (1/10) e 2ª subtração (1/100) respectivamente; B, PDE Situação Pb sem cobre frente a Fibronectina, 1ª subtração (1/10) e 2ª subtração (1/100) respectivamente; C, PDE Situação Pb sem cobre frente a colágeno tipo I, 1ª subtração (1/10) e 2ª subtração (1/100) respectivamente; E, PDE Situação Pb sem cobre frente a colágeno tipo IV, 1ª subtração (1/10) e 2ª subtração (1/100) respectivamente.

O produto diferencialmente expresso foi então clonado e seqüenciado e as análises das ESTs resultantes foram feitas empregando o banco de dados não redundante GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) utilizando-se o programa BLASTx (ALTSCHUL, et al., 1997).

### 5.2.3. Produtos diferencialmente expressos

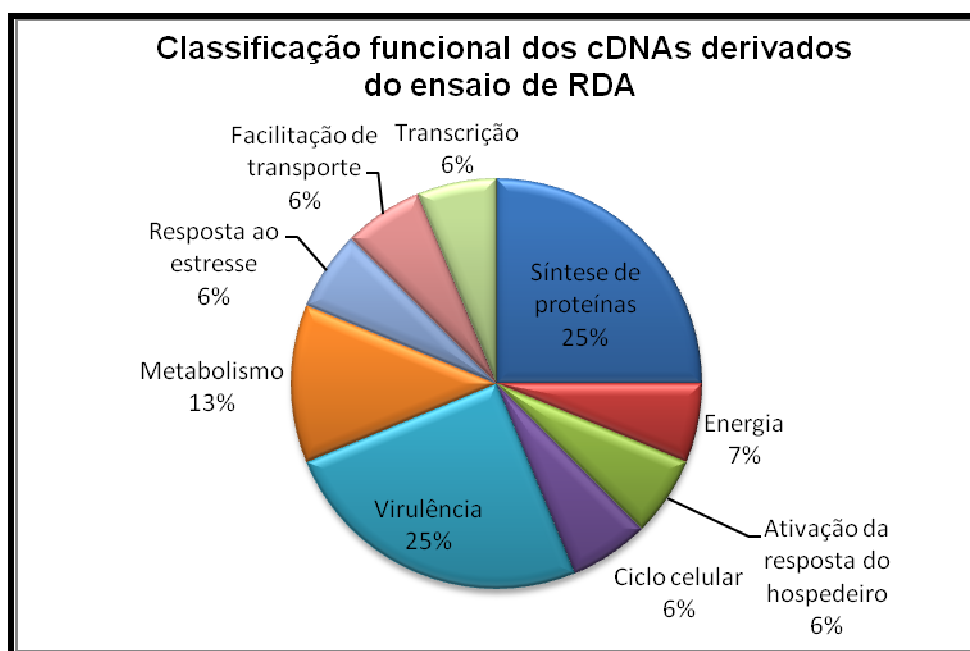
Um total de 192 clones foi seqüenciado para cada situação. Estes foram analisados e agrupados em dezenove *clusters*, com doze *contigs* e sete *singlets*. As seqüências (*contigs* e *singlets*) apresentaram homologia a dezenove proteínas que estão representadas na tabela 2. As proteínas relacionadas às condições de contato com as ECM foram 12 para laminina, 11 para fibronectina, 05 para colágeno tipo IV e 07 para tipo I. Enolase e RDS foram comuns as quatro condições.

**Tabela 2.** Análise dos clones seqüenciados obtidos de *P. brasiliensis* após depleção de cobre frente aos diferentes componentes da MEC, após aplicação da técnica de RDA nas seguintes situações 1) Sem cobre + Laminina, 2) Sem cobre + Fibronectina, 3) Sem cobre + Colágeno Tipo I e 4) Colágeno Tipo IV.

Produto Gênico	E-value	Nº de acesso	Situação	Freq	Processo biológico
ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1 [Paracoccidioides brasiliensis Pb01]	5e-06	<a href="#">gb EEH39500.1 </a>	1	2	Síntese de proteínas
ATP-dependent helicase HepA [Escherichia coli 83972]	4e-35	<a href="#">ref ZP_04002847.1 </a>	1,2	23/2	Síntese de proteínas
Cell surface protein, putative [Aspergillus flavus NRRL3357]	1e-07	<a href="#">ref XP_002373510.1 </a>	1,2	1/1	Sem definição
Cytochrome P450 monooxygenase [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]	1e-06	<a href="#">gb EEH44888.1 </a>	1,2,3	2/1/15	Energia
Cytokine inducing-glycoprotein [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]	2e-24	<a href="#">ref XP_569968.1 </a>	1,2,3	35/1/11	Ativação da resposta do hospedeiro
Cytoplasm protein [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]	8e-07	<a href="#">ref XP_567593.1 </a>	1	1	Sem definição
Elongation protein 4 homolog (S. cerevisiae) [Homo sapiens]	3e-08	<a href="#">emb CAM13057.1 </a>	2	2	Síntese de proteínas
Enolase [Paracoccidioides brasiliensis Pb01]	3e-25	<a href="#">gb ABQ45367.1 </a>	1,2,3,4	10/4/8/3	Virulência
G1/s-specific cyclin pcl1 (cyclin hcs26) [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]	5e-10	<a href="#">ref XP_571897.1 </a>	3,4	15/6	Ciclo celular
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]	2e-06	<a href="#">ref XP_572045.1 </a>	4	1	Virulência
Glutamine synthetase [Paracoccidioides brasiliensis Pb01]	1e-27	<a href="#">gb EEH36585.1 </a>	2,4	3/3	Virulência
LAG1 longevity assurance homolog 5 (S. cerevisiae), isoform CRA_a [Homo sapiens]	8e-15	<a href="#">gb EAW58131.1 </a>	1	6	Biossíntese de ceramidas e esfingolipídeos
Lipase/esterase family protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb01]	3e-04	<a href="#">gb EEH38368.1 </a>	4	1	Metabolismo
MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae), isoform CRA_b [Homo sapiens]	9e-13	<a href="#">gb EAW66931.1 </a>	1	2	Transcrição
Oxidoreductase, short chain	9e-19	<a href="#">ref XP_002374056.1 </a>	1,2	2/2	Metabolismo

dehydrogenase/reductase family [Aspergillus flavus NRRL3357]						
Rds1 protein [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]	3e-20	<a href="#">ref XP_568514.1 </a>	1,2,3,4	42/26/42/3	Resposta estresse	a
Ribonuclease Z [Paracoccidioides brasiliensis Pb01]	3e-04	<a href="#">gb EEH38805.1 </a>	2	1	Síntese proteínas	de
Serine/threonine-protein phosphatase PP1 [Paracoccidioides brasiliensis Pb01]	8e-37	<a href="#">gb EEH37862.1 </a>	1,4	1/13	Virulência	
Wd and tetratricopeptide repeat protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb01]	5e-12	<a href="#">gb EEH34570.1 </a>	2	1	Facilitador de transporte	de

As ESTs que apresentaram homologia com proteínas foram classificadas conforme sua funcionalidade (figura 3), para o melhor entendimento da relação fungo-MEC quando em situação de depleção do cobre.



**Figura 3.** Classificação funcional dos cDNAs derivados do ensaio de RDA de *P. brasiliensis* após depleção de cobre frente aos componentes da MEC. Classificação baseada no programa Gene Ontology.

Além destas proteínas funcionais, foram identificadas catorze proteínas hipotéticas ou preditas que ainda não têm sua função conhecida (Tabela 3).

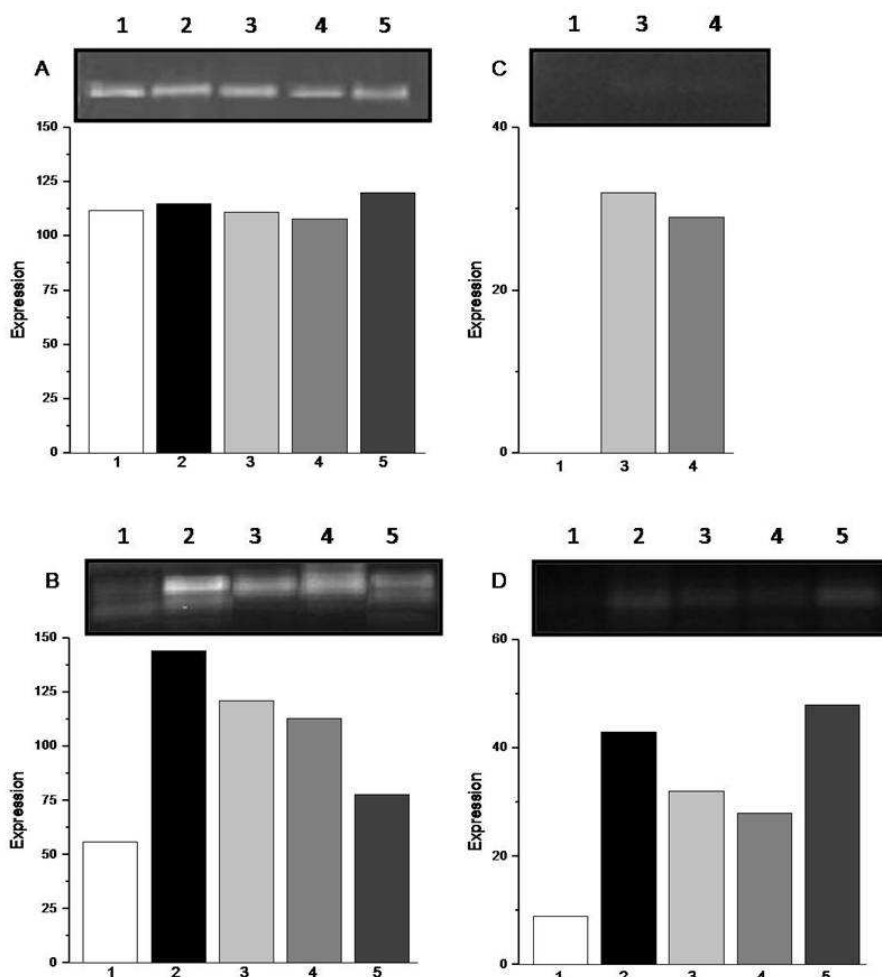
**Tabela 3.** Análise dos clones seqüenciados obtidos de *P. brasiliensis* após depleção de cobre frente aos diferentes componentes da MEC, após aplicação da técnica de RDA. Proteínas hipotéticas ou preditas

<b>Proteína</b>	<b>E-value</b>	<b>Nº de acesso</b>	<b>Situação</b>	<b>Freq</b>
<b>Conserved hypothetical protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]</b>	5e-21	<a href="#">gb EEH50528.1 </a>	1	1
<b>Predicted protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb03]</b>	7e-25	<a href="#">gb EEH18749.1 </a>	1,2	9/1
<b>Predicted protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]</b>	2e-14	<a href="#">gb EEH48330.1 </a>	4	2
<b>Conserved hypothetical protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb03]</b>	5e-04	<a href="#">gb EEH19278.1 </a>	1	2
<b>Conserved hypothetical protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb01]</b>	5e-18	<a href="#">gb EEH34498.1 </a>	1	1
<b>Hypothetical protein PABG_06807 [Paracoccidioides brasiliensis Pb03]</b>	5e-08	<a href="#">gb EEH16720.1 </a>	3,4	23/1
<b>Conserved hypothetical protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb01]</b>	1e-04	<a href="#">gb EEH37775.1 </a>	2	3
<b>Hypothetical protein CNH03250 [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]</b>	1e-25	<a href="#">ref XP_572495.1 </a>	1	2
<b>Hypothetical protein CNBE1600 [Cryptococcus neoformans var. neoformans B-3501A]</b>	3e-08	<a href="#">ref XP_775445.1 </a>	1,2	9/2
<b>Hypothetical protein [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]</b>	1e-06	<a href="#">ref XP_571062.1 </a>	2	1
<b>Hypothetical protein CNBM0020 [Cryptococcus neoformans var. neoformans B]</b>	2e-25	<a href="#">ref XP_772265.1 </a>	3,4	4/1
<b>Hypothetical protein [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]</b>	2e-11	<a href="#">ref XP_570609.1 </a>	4	1
<b>Hypothetical protein HCAG_03395 [Ajellomyces capsulatus NAm1]</b>	4e-19	<a href="#">ref XP_001541298.1 </a>	1	6
<b>Hypothetical protein HCAG_09262 [Ajelloyces capsulatus]</b>	1e-07	<a href="#">ref XP_001535809.1 </a>	4	1



#### 5.2.4. Validação da expressão diferencial por RT-PCR

Para confirmação dos resultados por RT-PCR, foram desenhados oligonucleotídeos específicos para as ESTs que foram mais redundantes: enolase (figura 4B), glicoproteína indutora de citocina (figura 4C) e RDS (figura 4D) e como controle foram utilizados os oligonucleotídeos específicos para o gene L34 de *P. brasiliensis* (figura 4A). Após a amplificação dos produtos das diferentes condições (Sem Cu e Sem Cu frente aos componentes da MEC), foi possível comprovar a regulação aumentada dos transcritos na situação em que *P. brasiliensis* foi colocado em contato com os diferentes componentes da MEC (figuras 4B, 4C e 4D).

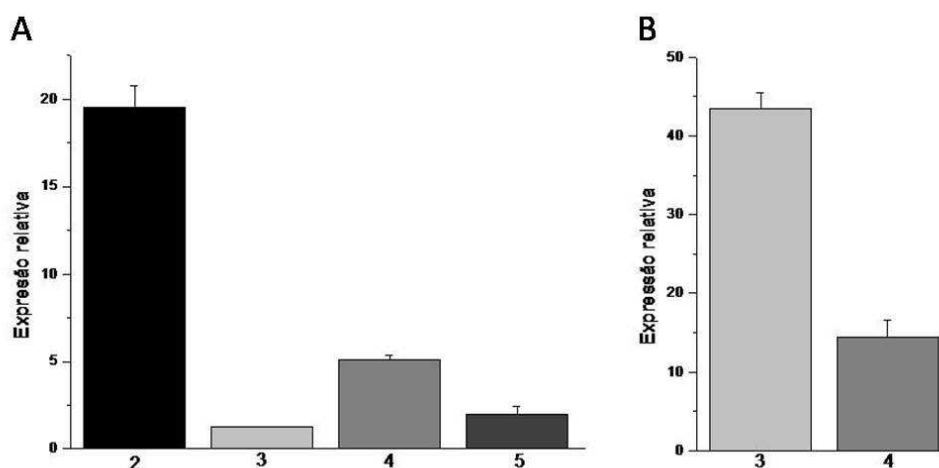


**Figura 4.** Confirmação da expressão diferencial por RT-PCR. A) Gel e gráfico representando a intensidade das bandas para o gene L34; B) Gel e gráfico representando a intensidade das bandas para Enolase; C) Gel e gráfico representando a intensidade das bandas para a Glicoproteína Indutora de Citocina; D) Gel e gráfico representando a intensidade das bandas para RDS. Nas figuras os números 1,

2, 3, 4, 5 representam consecutivamente Pb sem Cobre, Pb sem cobre frente a Laminina, Pb sem cobre frente a Fibronectina, Pb sem cobre frente a Colágeno tipo I, Pb sem cobre frente a Colágeno tipo IV e Controle Negativo.

### 5.2.5. Validação da expressão diferencial por *Real Time PCR*

Para a validação dos resultados por *Real Time PCR*, foram utilizados oligonucleotídeos específicos para duas das ESTs já avaliadas por RT-PCR: Enolase e Glicoproteína induzida por citocina, sendo utilizado L34 como controle. Após a análise pôde-se também confirmar por essa metodologia a regulação aumentada dos transcritos na situação em que *P. brasiliensis* foi colocado em contato com os diferentes componentes da MEC. Enolase foi 20 vezes mais expressa em contato com laminina, seguido de colágeno tipo I, onde houve um aumento de cinco vezes, enquanto que, a glicoproteína induzida por citocina foi 45 vezes mais expressa frente à fibronectina, seguida de colágeno tipo I, onde houve um aumento de 15 vezes na expressão (figura 5).



**Figura 5.** Quantificação dos transcritos diferencialmente expressos por Real Time PCR. A) Quantificação da expressão de Enolase frente a Laminina (2), Fibronectina (3), Colágeno tipo I (4) e Colágeno tipo IV (5). B) Quantificação da expressão de Glicoproteína induzida por citocina frente a Fibronectina (3) e Colágeno tipo I (4).

### **5.3. Análise de proteínas diferencialmente expressas por *P. brasiliensis* após depleção de Cobre frente aos componentes da MEC**

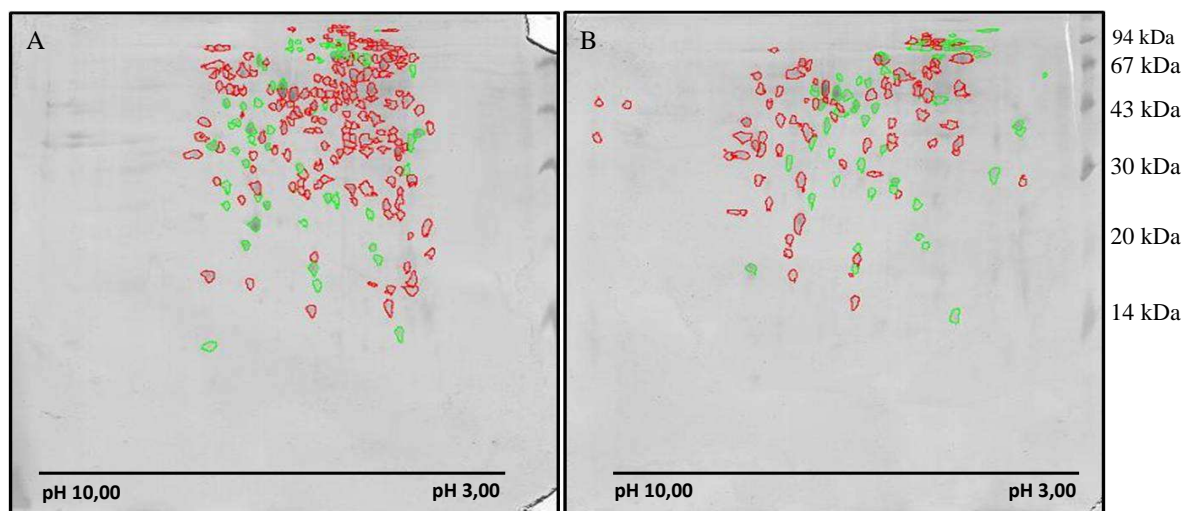
#### **5.3.1. Extração total de proteínas de *P. brasiliensis* depletado de Cobre**

A extração total de proteínas foi realizada em cinco condições de cultivo: (I) *P. brasiliensis* cultivado em MVM sem Cobre por 3h a 37°C sob agitação, (II) *P. brasiliensis* cultivado em MVM sem Cobre por 3h a 37°C e depois a crescido de Laminina (SIGMA) 50ug/mL; (III) *P. brasiliensis* cultivado em MVM sem Cobre por 3h a 37°C e depois acrescentado de Fibronectina (SIGMA) 50ug/mL; (IV) *P. brasiliensis* cultivado em MVM sem Cobre por 3h a 37°C e depois acrescentado de Colágeno I (SIGMA) 50ug/mL e (V) *P. brasiliensis* cultivado em MVM sem Cobre por 3h a 37°C e depois acrescentado de Colágeno tipo IV (SIGMA) 50ug/mL, sendo que, depois de acrescentados os componentes da MEC as cultura foram mantidas por mais 2 horas a 37°C sob agitação. A concentração protéica dos extratos ficaram em torno de 2,5 mg/mL e em seguida avaliadas por SDS-PAGE.

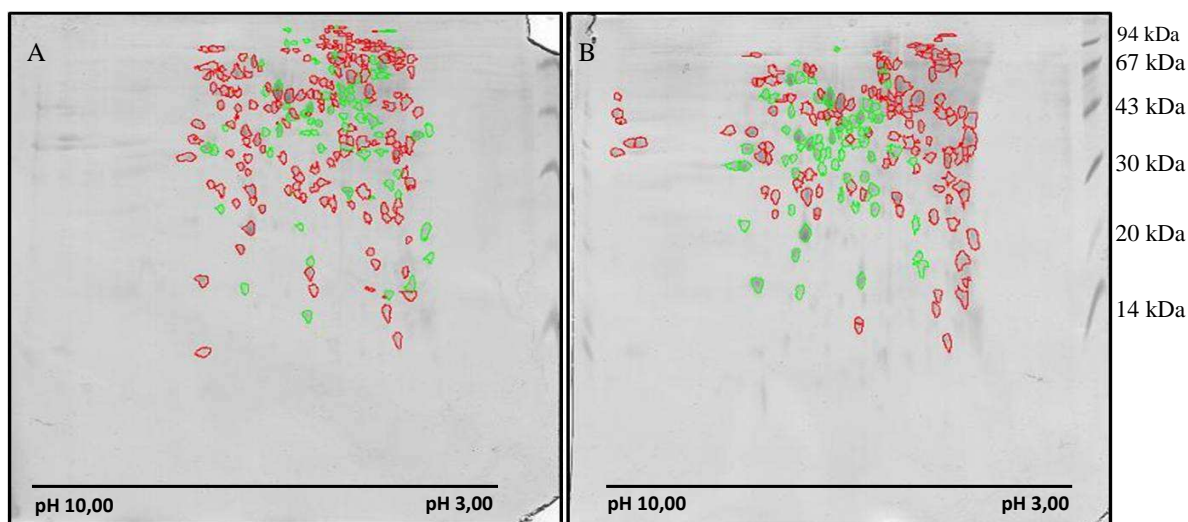
#### **5.3.2. Análise protéica por Eletroforese Bidimensional**

Os extratos totais de proteínas de cada situação foram submetidos à eletroforese bidimensional corados por *Coomassie Blue* para a análise da expressão das diversas proteínas de acordo com os pontos isoelétricos e com a massa molecular. De maneira geral foi observado de 164 a 242 proteínas com PI variando de 2,4 a 9,6 e massa molecular de 5 a 112 kDa. As figuras 6, 7, 8 e 9 demonstram a comparação entre o perfil protéico de *P. brasiliensis* depletado de cobre e os perfis protéicos de *P. brasiliensis* frente a laminina, fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV respectivamente. A análise dos géis foi feita por meio de software Image Master 2D Platinum 6.0, determinando o número e localização das manchas, bem como os

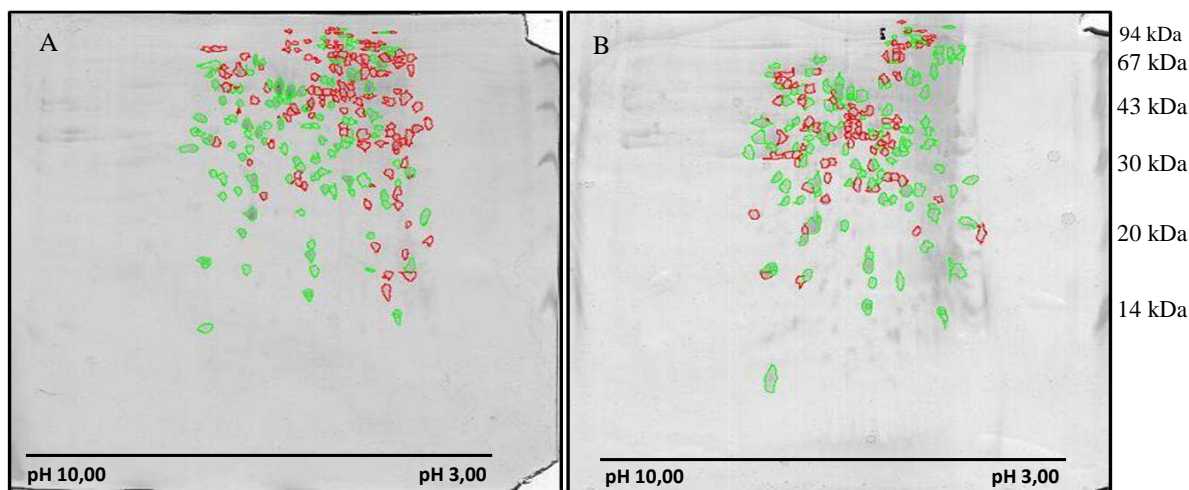
valores dos pls e massas moleculares. Nas figuras as manchas marcadas em verde são semelhantes nas duas situações e as em vermelho são as exclusivas para cada situação.



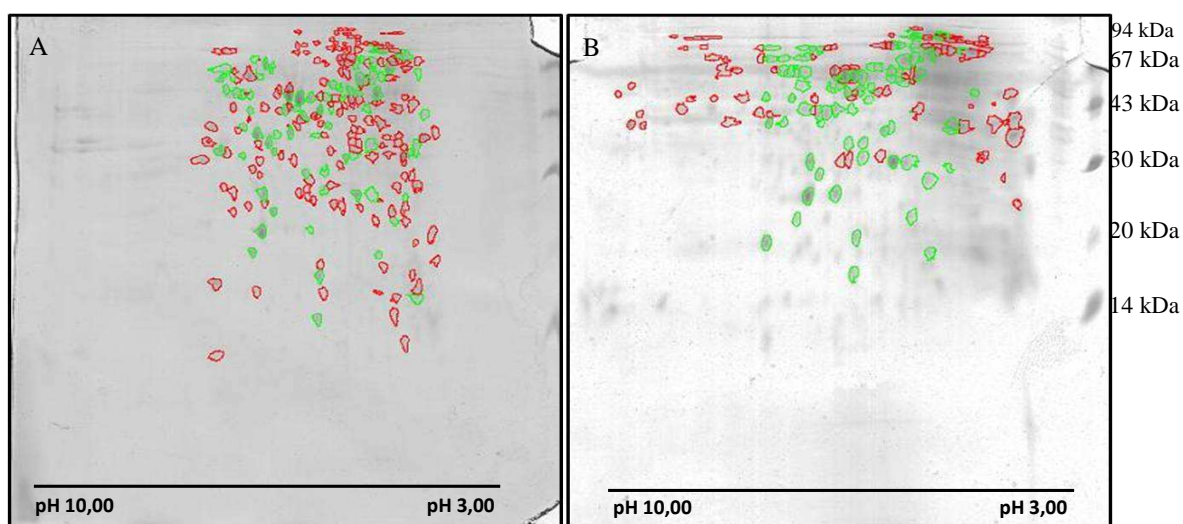
**Figura 6:** Eletroforese bidimensional de A) *P. brasiliensis* sem cobre; B) *P. brasiliensis* sem cobre frente a Laminina. 406 proteínas com pI variando entre 2,4 a 9,7 e massa molecular entre 6 a 104 kDa



**Figura 7:** Eletroforese bidimensional de A) *P. brasiliensis* sem cobre; B) *P. brasiliensis* sem cobre frente à Fibronectina. 439 proteínas com pI variando entre 4,2 a 9,6 e massa molecular entre 11 e 103 kDa



**Figura 8:** Eletroforese bidimensional de A) *P. brasiliensis* sem cobre; B) *P. brasiliensis* sem cobre frente à Colágeno tipo I. 477 proteínas com pI variando entre 2,4 a 7,9 e massa molecular entre 5 e 91 kDa



**Figura 9:** Eletroforese bidimensional de A) *P. brasiliensis* sem cobre; B) *P. brasiliensis* sem cobre frente à Colágeno tipo IV. 407 proteínas com pI variando entre 3,8 a 9,5 e massa molecular entre 12 e 112 kDa

A análise comparativa preliminar das corridas eletroforéticas demonstrou a existência de 118 manchas semelhantes entre *P. brasiliensis* sem cobre e *P. brasiliensis* sem cobre frente a laminina, 140 manchas semelhantes entre *P. brasiliensis* sem cobre e *P. brasiliensis* sem cobre frente a Fibronectina, 220 manchas semelhantes entre *P. brasiliensis* sem cobre e *P. brasiliensis* sem cobre frente a Colágeno tipo I e 158 manchas semelhantes entre *P. brasiliensis* sem cobre e *P. brasiliensis* sem cobre frente a Colágeno tipo IV. Foram observados manchas

exclusivas entre *P. brasiliensis* sem cobre frente à Laminina, Fibronectina e Colágeno tipo I e Colágeno tipo IV respectivamente, conforme demonstrado na tabela 4 abaixo.

**Tabela 4.** Análise de proteínas diferencialmente expressas frente à depleção de Cobre

<b>Depleção de Cobre</b>				
	<b>Laminina</b>	<b>Fibronectina</b>	<b>Colágeno tipo I</b>	<b>Colágeno tipo IV</b>
Semelhantes	118	140	220	158
Exclusivas	105	127	125	86

## 6. Discussão

Provavelmente, todos os organismos na terra dependem dos metais de transição para sua sobrevivência. Cobre e ferro são particularmente importantes, pois participam de reações vitais e são cofatores de muitas enzimas do metabolismo além de serem nutrientes essenciais para a manutenção da vida (EIDE, 1998). Quando em excesso esses metais podem ser tóxicos, portanto distúrbios nos níveis de ferro e cobre, podem causar graves efeitos no metabolismo celular, crescimento e desenvolvimento dos organismos (DE FREITAS, 2002).

Neste estudo foi proposta análise de transcritos e de proteínas expressas em condições de depleção de cobre, na presença de quatro matrizes extracelulares – laminina, fibronectina e colágeno I e IV, mimetizando as condições de infecção por *P. brasiliensis* por meio das técnicas de RDA (*Representational Difference Analysis*) e eletroforese bidimensional. Em nossos resultados a depleção de cobre exerceu bastante influência no padrão de adesão de *P. brasiliensis* aos componentes da MEC. Após a depleção de cobre, houve um aumento significativo no padrão de adesão a todos os componentes da MEC.

O cobre existe como um elemento traço na crosta terrestre, sendo apenas 0.00007% dos elementos que a formam, e se encontra em baixíssimas concentrações nos organismos vivos. Entretanto, o cobre é um cofator catalítico e estrutural indispensável que guia uma gama diversa de importantes processos biológicos que são essenciais para a vida. Através da coordenação de proteínas com o apoio de um vasto espectro de ligantes químicos, incluindo enxofre, oxigênio e nitrogênio, o cobre confere mudanças na estrutura de proteínas, na atividade catalítica e na interação proteína-proteína e assim, controla uma diversificada série de eventos bioquímicos e reguladores nos organismos vivos (KIM et al., 2008).

Um dos aspectos mais estudados do cobre é sua presença em proteínas que são requeridas para a aquisição de ferro pelas células. Estas proteínas que são dependentes de cobre auxiliam na entrada de ferro nas células além de participar da biogênese de diversas outras proteínas que participam do metabolismo celular. Essa participação indica sua importante função nos organismos (KORNITZER, 2009; JUNG & KRONSTAD, 2009; HOWARD, 2003; RUTHERFORD & BIRD, 2004; KOSMAN, 2003; HOWARD, 1999).

Porém, estudos recentes indicam que o cobre modula determinantes críticos de virulência de patógenos fúngicos, com seu papel indo muito além da participação na aquisição de Ferro (KIM et al., 2008). Por exemplo, uma das estratégias utilizadas por *Cryptococcus neoformans* durante o contato com o hospedeiro é a produção de cápsula polissacarídica que tem propriedades antifagocitárias e é utilizada como fator de defesa da resposta imune do hospedeiro, além de também se defender deste ataque se alojando nos macrófagos do hospedeiro, para assim se disseminar e por fim causar micose sistêmica no hospedeiro (FAN et al., 2005). Junto a todas as modificações transcricionais que acompanha a adaptação aos macrófagos do hospedeiro, a expressão de genes que codificam a enzima lacase e o sistema Cu-dependente ferro, ferroxidase/permease, está aumentada (LIN & HEITMAN, 2006). Lacase é uma enzima que possui diversos sítios de ligação a cobre que oxida compostos fenólicos e está envolvida na biossíntese de melanina. A melanina, um importante fator de virulência em *C. neoformans*, é essencial para a sua adaptação no meio intracelular dos macrófagos, pois promove proteção contra a produção de espécies reativas de oxigênio geradas durante o *burst* oxidativo, que é a principal forma de defesa do hospedeiro contra o patógeno. Por conta disso, a aquisição de níveis adequados de cobre demonstra contribuir para a virulência de *C. neoformans* (KIM et



al., 2008). Do mesmo modo, a melanina também é um fator de virulência para *P. brasiliensis*. A capacidade de *P. brasiliensis* produzir melanina foi primeiramente descrita por Gómez et al. (2001) e em seus resultados detectaram a atividade da lacase em extratos protéicos do fungo que está ligada à síntese de melanina em leveduras. Da Silva et al. (2006) demonstraram que leveduras melanizadas de *P. brasiliensis* aumentaram sua resistência à fagocitose protegendo o fungo contra a ação de macrófagos do hospedeiro além de demonstrarem um aumento de sua resistência a drogas antifúngicas como anfotericina B, cetoconazol, fluconazol, itraconazol e sulfamethoxazol. Da Silva et al. (2009) posteriormente demonstraram que a melanina é um fator importante na patogênese de *P. brasiliensis*, pois combina a redução da fagocitose e protege as células fúngicas de radicais oxidativos produzidos pelas células dos hospedeiros.

A caracterização de genes envolvidos na etapa inicial da interação fungo hospedeiro é de grande valor, que pode resultar na identificação de alvos potenciais para futuras pesquisas terapêuticas em busca de novas drogas que impedirão precocemente o processo infeccioso. Em vista disso, a técnica de RDA foi empregada neste estudo, buscando identificar genes envolvidos na interação entre *P. brasiliensis* e componentes da matriz extracelular na privação de cobre. Esta metodologia foi empregada com sucesso por BAILÃO et al. (2006) para estudar a interação parasito-hospedeiro em *P. brasiliensis*. Este trabalho pôde avaliar transcritos diferencialmente expressos durante a infecção *in vivo* em modelo animal e durante contato com sangue humano. Neste trabalho, genes relacionados com a aquisição de ferro e cobre, síntese de melanina e defesa celular tiveram sua expressão aumentada no modelo da infecção *in vivo*. Já durante o contato com sangue humano, genes relacionados com a remodelação da parede celular/síntese tiveram sua expressão aumentada. Em C.

*neofomans*, esta técnica foi também empregada para verificar genes diferencialmente expressos de *C.neofomans* a 25 e 37°C (ROSA E SILVA et al., 2008), mas até o momento, não temos conhecimento de trabalho algum, enfocando esta interação com componentes da matriz na condição de depleção de cobre.

A proteína encontrada com maior redundância neste trabalho foi a RDS1. Essa proteína já foi identificada em vários fungos como *Neurospora crassa*, *Magnaporthe grisea*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium graminearum* e *Ustilago maydis* parece e parece estar relacionada à resposta do fungo a situações de estresse. Em *Schizosaccharomyces pombe* foram observadas alterações de sua expressão quando o fungo foi submetido a diferentes condições como privação de glicose, amônia e fosfato, além de mudanças na concentração de CO<sub>2</sub> e temperatura (LUDIN et al., 1995), bem como mudanças nas concentração de ferro e cobre (RUSTICI et al., 2007). Kraus et al. (2004), verificaram pela técnica de microarranjo, uma expressão aumentada dessa proteína em *C. neofomans* mantidos a 37°C e de forma similar, Rosa e Silva et al. (2008), comparando a levedura mantida a 25 e a 37°C, verificaram pela técnica de RDA, aumento de sua expressão.

Outra proteína encontrada com expressão aumentada foi glicose 6-fosfato desidrogenase, que está envolvida no primeiro passo do ciclo da pentose fosfato, catalisando a oxidação de glicose 6-fosfato a gluconolactona 6-fosfato tendo o NADP<sup>+</sup> e NAD<sup>+</sup> como acceptor de elétrons. É a proteína chave das vias oxidativa da pentose e da Entner-Doudoroff, presente em bactérias, Archaea e em todas as células eucarióticas (HANSEN et al., 2002). Trabalhos têm verificado que cepas mutantes para G6PD de *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, e *Pseudomonas aeruginosa* são mais suscetíveis a espécies intermediárias de oxigênio e nitrogênio, sugerindo que esta enzima tem papel importante durante o estresse oxidativo (GREENBERG et al., 1990;

LUNDBERG et al., 1999; MA et al., 1998). Lundberg et al. (1999), também verificaram, que as cepas mutantes se tornaram avirulentas quando inoculadas em camundongos e da mesma forma, Saavedra e Sesma (2005), observaram em *Enterococcus mundtii*, papel importante da G6PD frente a espécies reativas de oxigênio além de sugerir participação do ferro como modulador da atividade enzimática da G6PD. O  $Fe^{+}$  está presente em várias enzimas como cofator nos sítios ativos, sendo um elemento indispensável para a célula. Por outro lado, é de conhecimento que o  $Fe^{+}$  promove, em determinadas concentrações, a formação de radicais hidroxil (reação de Fenton), que é altamente danoso para os componentes celulares. O  $Fe^{+}$  e estresse oxidativo estão intimamente relacionados e rigorosamente controlados pela maquinaria celular para proporcionar uma concentração suficiente para os processos fisiológicos, ao mesmo tempo em que minimiza seus efeitos tóxicos (ZHENG et al., 1999). Em nosso trabalho, a expressão diferencial de G6PD pode residir no fato que o fungo, em situação de estresse pela falta do cobre começa a adquirir o ferro existente no meio para suprir suas necessidades, o que aumentaria a taxa de infecção ao hospedeiro. Isso justificaria o observado aumento da expressão desta proteína que tem o ferro como principal modulador e que protege o fungo da resposta oxidativa do hospedeiro.

Glutamina é considerada molécula central do metabolismo celular do nitrogênio, sendo um dos principais compostos doadores para formação de moléculas nitrogenadas. Em nosso estudo, foi encontrada expressão aumentada da enzima glutamina sintetase (GSA), que catalisa a formação de glutamina a partir de glutamato, amônia e ATP. No campo da bacteriologia, vários trabalhos têm relatado o envolvimento de vias relacionadas ao metabolismo basal, a nutrição com virulência, dentre os quais está a via metabólica da glutamina (HENDRIKSEN et al., 2008; KLOOSTERMAN et al., 2006; TAMURA et al., 2002; TULLIUS et al., 2003). Em

estreptococos do grupo B, foi sugerido que o transportador de glutamato tinha papel importante para a aderência a fibronectina e para virulência em animais de experimentação (TAMURA et al., 2002). Em *Mycobacterium tuberculosis*, GSA parece ser essencial para sobrevivência da bactéria dentro de macrófagos (TULLIUS et al., 2003). Klose e Mekalanos (1997) verificaram em *Salmonella typhimurium* que cepas mutantes para GSA apresentavam redução acentuada da virulência e capacidade de sobrevivência no hospedeiro. Mais recentemente, Si et al. (2009) avaliaram o papel da GSA na patogênese de *Streptococcus suis* sorotipo 2 em camundongos e verificaram que as cepas mutantes aderiam menos em células epiteliais HEP-2 *in vitro*. Os grupos de animais infectados com cepas mutantes apresentaram taxas menores de mortalidade e morbidade e menor capacidade de colonizar e invadir órgãos como coração, pulmão, fígado, rim, baço e cérebro. A GSA também foi encontrada por Bailão et al. (2006) sendo expressa por *P. brasiliensis* tanto no modelo *in vivo* quanto após o fungo ser mantido em contato com sangue humano. Desta forma, a GSA poderia estar envolvida no mecanismo de invasão de *P. brasiliensis*, o que precisa ser melhor estudado, sendo também necessário localizá-la tanto no fungo quanto na interação com modelos celulares.

Nas condições em que *P. brasiliensis* foi mantido em meio contendo laminina, fibronectina e colágeno I, foi observado aumento na expressão de uma glicoproteína induzida por citocina (CIG1). Em estudos anteriores, não foram verificadas diferenças na expressão da CIG1 quando *C. neoformans* foi mantido a 25 e 37°C, mas observaram diferença de até 10 vezes na expressão do fungo cultivado em meio depletado de ferro, indicando papel importante na aquisição, transporte e resposta a esse metal (STEEN et al, 2003; KRONSTAD JUNG, 2008). Em outro estudo, Lian et al. (2005) verificaram que quando o gene CIG1, que codifica para a glicoproteína, foi

nocauteado resultou em uma cepa com crescimento deficiente no meio sem ferro (LIAN et al., 2005, JUNG e KRONSTAD, 2008). Em nosso estudo, o cobre foi depletado no meio quimicamente definido MVM, porém o ferro continuou presente. Assim, no sentido de contrabalançar essa ausência, a aquisição e transporte de ferro foram aparentemente aumentadas para fornecer este nutriente essencial, conforme observamos em nosso trabalho. CIG1 pode estar envolvida na retenção de ferro na superfície da célula e/ou na captação de ferro por sideróforos, já que esta proteína possui analogia com nanoproteínas de leveduras Fit1p, Fit2p e Fit3p (*facilitator of iron transport protein*), que são componentes da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e tem como função facilitar a aquisição de ferro. Estas proteínas podem agir para melhorar a eficiência na aquisição de ferro pelos sistemas celulares atuando como uma ponte entre a parede celular e o ferro. (Protchenko et al., 2001).

Por fim, foi encontrada expressão aumentada de enolase que recentemente, foi descrita como ligante de fibronectina, relacionada à adesão de *P. brasiliensis* e considerado como fator de virulência (DONOFRIO et al., 2009). A enolase é uma metaloenzima importante da via glicolítica que catalisa a desidratação de 2-fosfo-D-glicerato (PGA) formando fosfoenolpiruvato (PEP). A mesma enzima catalisa a hidratação de PEP para formar PGA durante a gliconeogênese. Durante muitos anos a enolase foi considerada apenas como uma enzima glicolítica solúvel. No entanto, estudos recentes têm mostrado que a enolase é uma proteína com diversas distribuições e funções biológicas (PANCHOLI, 2001), expressas em mais de um local em eucariotos e procariontes e que apresentam distintas funções biológicas como a enolase ligante de laminina em *Staphylococcus aureus* (CARNEIRO et al., 2004), além de enolase ligante de plasminogênio humano de *Trichomonas vaginalis* (MUNDODI et

al., 2008), *Streptococcus pneumoniae* (BERGMANN et al., 2001), *Leishmania mexicana* e *Fasciola hepatica* (BERNAL et al., 2004).

Em nosso trabalho, a enolase foi diferencialmente expressa frente a todos as matrizes, e não somente a fibronectina como descrito anteriormente por Donofrio et al. (2009), porém, vale lembrar que a cepa utilizada neste último trabalho foi a cepa de *P. brasiliensis* 18, podendo ser este também um importante fator a ser investigado. Apesar disto, dados de Nogueira et al. (submetido para publicação) também demonstraram a ligação da enolase à laminina e colágeno tipo I além da fibronectina, corroborando os dados encontrados neste trabalho. Além disto, os dados de Nogueira et al. (2009) também demonstram a enolase como um importante fator de virulência de *P. brasiliensis*. Os dados encontrados neste estudo corroboram dados anteriores que sugerem que *P. brasiliensis* poderia utilizar a enolase para aderir e talvez invadir células hospedeiras, através da interação com plasminogênio humano (DONOFRIO et al., 2009; BERGMANN et al., 2001; BERNAL et al., 2004; PANCHOLI, 2001). A habilidade de microorganismos patogênicos em vincular plasminogênio tem sido associada com propriedades invasivas (COLEMAN et al., 1997; LÄHTEENMÄKI et al., 1995; MUNDODI et al., 2008) e poderia facilitar a sua penetração à membrana basal para permitir associações com fibronectina e laminina. Embora *P. brasiliensis* seja considerado um patógeno intracelular facultativo, adesinas ligantes de fibronectina também podem mediar invasão às células.

A depleção de cobre levou a um aumento na adesão do fungo aos componentes da MEC. A ausência do cobre causou certo estresse ao fungo, porém ao ser colocado frente aos componentes da MEC houve uma sinalização para eles se ligarem e assim tentar suprir sua necessidade, mimetizando uma situação *in vivo*, já que as concentrações de cobre são mantidas em baixas concentrações no hospedeiro.

A interação fungo-hospedeiro abrange uma rede complexa de vias metabólicas e de sinalização que se interligam para responder a uma determinada situação ou condição do meio. Um dos objetivos deste trabalho foi caracterizar genes diferencialmente expressos de *P. brasiliensis* em contato com componentes da matriz extracelular. Neste sentido, a técnica de RDA foi extremamente útil, fornecendo-nos uma visão global da situação da célula naquele momento. Através dos nossos resultados do RDA pudemos ver que transcritos relacionados à virulência foram expressos frente a todos os componentes da MEC explicando o aumento na adesão do fungo. Além disso, um grande número de proteínas hipotéticas e preditas foi encontrado, com suas funções ainda não descritas e que podem estar relacionadas ao processo de adesão de *P. brasiliensis* aos componentes da MEC.

As análises proteômicas demonstraram que um grande número de proteínas é diferencialmente expresso e a exploração desse arsenal pode trazer novas informações sobre a interação patógeno-hospedeiro.

## 7. Conclusões

- A depleção de Cobre levou a um aumento significativo da adesão de *P. brasiliensis* a todos os componentes da MEC;
- A análise de genes diferencialmente expressos durante o contato de *P. brasiliensis* privado de Cobre frente aos diferentes componentes da MEC mostrou que Enolase e RDS foram os mais expressos nas quatro condições com componentes da MEC. A análise por PCR em tempo real evidenciou que enolase foi mais expressa em contato com laminina, seguido de colágeno tipo IV, enquanto que, a glicoproteína induzida por citocina foi mais expressa frente à fibronectina; a presença de diferentes genes estava relacionada a processos biológicos como virulência, síntese protéica, metabolismo, energia, ativação de resposta relacionada ao hospedeiro, facilitação de transporte de íons, ciclo celular, transcrição e de resposta a estresse o que contribui para melhor entender a capacidade de adaptação do fungo às condições impostas pelo hospedeiro.
- A análise preliminar de proteínas expressas diferencialmente mostra uma grande quantidade particular a cada situação, sendo o contato com a fibronectina a que redundou em expressão de maior quantidade de proteínas exclusivas.



## 8. Referências

ANDREOTTI, P.F.; MONTEIRO DA SILVA, J.L.; BAILÃO, A.M.; DE ALMEIDA SOARES, C.M.; BENARD, G.; SOARES, C.P.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microb Infect**, 7: 875-881, 2005.

BAEZA, L.C. **Análise de genes diferencialmente expressos por *Trichophyton rubrum* na presença de queratina e tipagem molecular**. 93p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, Araraquara, 2006.

BAILÃO A.M.; SHRANK, A.; BORGES C.L.; PARENTE J.A.; DUTRA V., FELIPE, M.S.S; FIÚZA, R.B.; PEREIRA, M. & SOARES, C.M.A. **FEMS Immunol Med Microbiol** 51, 43-57, 2007.

BAILÃO, A.M.; SCHRANK, A.; BORGES, C.L.; DUTRA, V.; MOLLINARI-MADLUM E.E.W.I.; FELIPE, M.S.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.; MARTINS, W.S.; PEREIRA, M. & SOARES, C.M.A. **Microbes Infect** 8, 2686-2697, 2006.

BARBOSA, F.M.; FONSECA, F.L.; HOLANDINO, C.; ALVIANO, C.S.; NIMRICHTER, L. Glucuronoxylomannan-mediated interaction of *Cryptococcus neoformans* with human alveolar cells results in fungal internalization and host cell damage. **Microbes Infect** 8: 493–502, 2006.

BARLUZZI, R.; SALEPPICO, S.; NOCENTINI, A.; BOELAERT, J.R.; NEGLIA, R.; BISTONI, F.; BLASI, E. Iron overload exacerbates experimental meningoencephalitis by *Cryptococcus neoformans*. *J Neuroimmunol*. Nov;132(1-2):140-6, 2002.

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

BERGMANN, S., ROHDE, M., CHHATWAL, G. S. & HAMMERSCHMIDT, S. a-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. **Mol Microbiol**, 40: 1273–1287, 2001.

BERNAL, D., DE LA RUBIA, J. E., CARRASCO-ABAD, A. M., TOLEDO, R., MASCOMA, S. & MARCILLA, A. Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. **FEBS Lett**, 563: 203–206, 2004.

BRANDHORST, T.; WUTHRICH, M.; FINKEL-JIMENEZ, B.; KLEIN, B. A C-terminal EGF-like domain governs BAD1 localization to the yeast surface and fungal adherence to phagocytes, but is dispensable in immune modulation and pathogenicity of *Blastomyces dermatitidis*. **Mol Microbiol**; 48: 53-65. 2003.

CARNEIRO, C. R. W., POSTOL, E., NOMIZO, R., REIS, L. F. & BRENTANI, R. R. Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of *Staphylococcus aureus*. **Microbes Infect**, 6: 604–608. 2004.

CASTRO, N.D.A.; MAIA, Z.A.; PEREIRA, M.; SOARES, C.M. Screening for glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. **Genet Mol Res**, 30,4(2):326-45. 2005.

COLEMAN, J.L., GEBBIA, J.A., PIESMAN, J., DENGGEN, J.L., BUGGE, T.H., BENACH, J.L. Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. **Cell**, 89: 1111–1119, 1997.

CORMACK, B.; ROUSE, B.T.; BEVERLEY, S.M. Host-microbe interactions: fungi/viruses/parasites. **Curr Opin Microbiol**, 2: 343-347, 1999.

COSTA, M.; BORGES, C.L.; BAILÃO, A.M.; MEIRELLES, G.V.; MENDONÇA, Y.A.; DANTAS, S.F.I.M.; FARIA, F.P.; FELIPE, M.S.S.; MOLINARI-MADLUM, E.E.W.I.; MENDES-GIANNINI, M.J.; FIÚZA, R.B.; MARTINS, W.S.; PEREIRA, M.; SOARES, C.M.A. Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. **Microbiology**, 153(Pt 12):4194-207, 2007.

COUTINHO, Z.F.; SILVA, D; LAZERA, M.; PETRI, V; OLIVEIRA, R.M.; SABROZA, P.C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad. Saúde Publica**, v. 18, p. 1441-1454, 2002.

DA SILVA, M.B.; THOMAZ, L.; MARQUES, A.F.; SVIDZINSKI, A.E.; NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A.; TRAVASSOS, L.R.; TABORDA, C.P. Resistance of melanized yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* to antimicrobial oxidants and inhibition of phagocytosis using carbohydrates and monoclonal antibody to CD18. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Vol. 104(4): 644-648, 2009.

DAVIS-KAPLAN, S.R.; ASKWITH, C.C.; BENGTZEN, A.C.; RADISKY, D.; KAPLAN, J. Chloride is an allosteric effector of copper assembly for the yeast multicopper oxidase Fet3p: an unexpected role for intracellular chloride channels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(23):13641-5, 1998.

DE FREITAS, J.; WINTZ, H.; KIM, J. H.; POYNTON, H.; FOX, T.; VULPE, C. Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. **BioMetals**, 16: 185–197, 2003.

DONOFRIO, F.C.; CALIL, A.M.F.A.; MIRANDA, E.T.; FUSCO ALMEIDA, A.M.; BENARD, G.; SOARES, C.P.; VELOSO, S.N.; SOARES, C.M.A.S.; GIANNINI, M.J.S.M. Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. **Journal of Medical Microbiology**, 58, 2009.

DONOFRIO, F.C. **Isolamento e caracterização parcial de adesina de *Paracoccidioides brasiliensis* ligante de fibronectina.** Dissertação de mestrado. 108p. Araraquara, São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 2007.

EIDE, D.J. The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Annu. Rev. Nutr.** 1998.

FAN, W., KRAUS, P.R., BOILY, M.J. & HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* gene expression during murine macrophage infection. **Eukaryot. Cell**, 4, 1420–1433, 2005.

FELIPE, M.S.; ANDRADE, R.V.; ARRAES, F.B. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **J Biol Chem**, 280: 24706-24714, 2005.

FELIPE, M.S.; ANDRADE, R.V.; PETROFEZA, S.S. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. **Yeast.**, 20(3):263-71, 2003.

FILLER, S.G.; SHEPPARD, D.C. Fungal Invasion of Normally Non-Phagocytic Host Cells. **PLoS Pathog.** 2(12):e129, 2006.

FRANCO, M. Host–parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J Med Vet Mycol**, 25:5–18, 1987.

FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994.

GANCZ, H.; CENSINI, S.; MERRELL, D.S. Iron and pH homeostasis intersect at the level of Fur regulation in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Infect Immun**, Jan;74(1):602-14, 2006.

GÓMEZ, B. L.; NOSANCHUK, J. D.; DÍEZ, S.; YOUNGCHIM, S.; AISEN, P.; CANO, L. E.; RESTREPO, A.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A. J. Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. **Infection and Immunity**, p 5760-5767, 2001.

GONZALEZ, A.; GOMEZ, B.L.; DIEZ, S.; HERNANDEZ, O.; RESTREPO, A.; HAMILTON, A.J.; CANO, L.E. Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. **Infect. Immun**, v. 73, p.2486-2495, 2005.

GREENBERG, J. T.; MONACH, P.; CHOU, J. H.; JOSEPHY P. D.; DEMPLET, B. Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Vol. 87, pp. 6181-6185, 1990.

HANSEN, T; SCHLICHTING, B; SCHÖNHEIT, P. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: expression of the g6pd gene and characterization of an extremely thermophilic enzyme. **FEMS Microbiol Lett.**, 5,216(2):249-53, 2002.

HENDRIKSEN, W.T., KLOOSTERMAN, T.G., BOOTSMA, H.J., ESTEVAO, S., DE GROOT, R., KUIPERS, O.P., HERMANS, P.W. Site-specific contributions of glutamine-dependent regulator GlnR and GlnR-regulated genes to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, 76, 1230–1238, 2008.

HEYMANN P, ERNST JF, WINKELMANN G. Identification of a fungal triacetylfusarinine C siderophore transport gene (TAF1) in *Saccharomyces cerevisiae* as a member of the major facilitator superfamily. **Biometals** 12: 301–306, 1999.

HUBANK, M.; SCHATZ, D.G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. **Nucleic. Acids Res.**, v. 22, p. 5.640-5.648, 1994.

HUNG, C.Y.; YU, J.J.; SESHAN, K.R.; REICHARD, U.; COLE, G.T. A parasitic phase-specific adhesin of *Coccidioides immitis* contributes to the virulence of this respiratory fungal pathogen. **Infect Immun**; 70: 3443-3456, 2002.

JUNG, W. H.; KRONSTAD, J. W. Iron and fungal pathogenesis: a case study with *Cryptococcus neoformans*. **Cellular Microbiology**, 10(2), 277–284. 2008.

JUNG, W.H.; SHAM, A.; WHITE, R.; KRONSTAD, J.W. Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Biol.** 4(12):e410, 2006.

K. PASTORIAN, L. HAWEL III, C.V. BYUS, Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs, **Anal. Biochem.** 283, 89-98, 2000.

KATO-MAEDA, M.; GAO, Q.; SMALL, P.M. Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts. **Cell. Microbiol.**, v.3, p. 713-719, 2001.

KIM, B.; NEVITT, T.; THIELE, D.J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. **Nature Chemical biology**, Vol. 4 N. 3, 2008.

KIM, H.S., BAILEY, H.; JAEKOWN, S.M.L. Deletion of hepatic Ctr1 reveals its function in copper acquisition and compensatory mechanisms for copper homeostasis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** February; 296(2): G356–G364, 2009.

KLEIN, B.S. Molecular basis of pathogenicity in *Blastomyces dermatitidis*: the importance of adhesion. **Curr Opin Microbiol**, 4: 339-343, 2000.

KLOOSTERMAN, T.G., HENDRIKSEN, W.T., BIJLSMA, J.J., BOOTSMA, H.J., VAN HIJUM, S.A., KOK, J., HERMANS, P.W., KUIPERS, O.P. Regulation of glutamine and glutamate metabolism by GlnR and GlnA in *Streptococcus pneumoniae*. **The Journal of Biological Chemistry**, 281, 25097–25109, 2006.

KLOSE, K.E., MEKALANOS, J.J. Simultaneous prevention of glutamine synthesis and high-affinity transport attenuates *Salmonella typhimurium* virulence. **Infection and Immunity**, 65, 587–596. 1997.

KRAUS, P.R., BOILY, M., GILES, S.S., STAJICH, J.E., ALLEN, A., COX, G.M. Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a Genomic-DNA microarray. **Eucaryotic Cell** 3, 2004.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. Paracoccidioidomycose. **Micologia médica**. São Paulo: Sarvie, p. 189–216, 1984.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-5, 1970.

LÄHTEENMÄKI, K., VIRKOLA, R., POUTTU, R., KUUSELA, P., KUKKONEN, M. & KORHONEN, T. K. Bacterial plasminogen receptors: in vitro evidence for a role in degradation of the mammalian extracellular matrix. **Infect Immun** 63, 3659–3664, 1995.

LAN CY, RODARTE G, MURILLO LA, JONES T, DAVIS RW. Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. **Mol Microbiol** 53: 1451–1469, 2004.

LENZI, H. L.; CALICH, V. L. G.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Two patterns of extracellular matrix expression in experimental paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v.38, p. 115-119, 2000.

LIN, X. & HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu. Rev. Microbiol.** 60, 69–105, 2006.

LISITSYN, N.; LISITSYN, N.; WIGLER, M. Cloning the differences between two complex genomes. **Science**, v. 259, p. 946-951, 1993.

LUNDBERG, B.E.; WOLF JR, R.E.; DINAUER, M.C.; XU, Y.; FANG, F.C.; Glucose 6-phosphate Dehydrogenase Is Required for *Salmonella typhimurium* Virulence and Resistance to Reactive Oxygen and Nitrogen Intermediates. **Infection and Immunity**, p. 436–438, 1999.

MA, J.F.; HAGER, P.W.; HOWELL, M.L.; PHIBBS, P.V.; HASSETT, D.J. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *zwf* gene encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase, an enzyme important in resistance to methyl viologen (paraquat). **J Bacteriol.**, 180(7):1741-9, 1998

MARVIN, M.E.; MASON, R.P.; CASHMORE, A.M. The CaCTR1 gene is required for high-affinity iron uptake and is transcriptionally controlled by a copper-sensing transactivator encoded by CaMAC1. *Microbiology*. Jul;150(Pt 7):2197-208, 2004.

MATUTE DR, SEPULVEDA VE, QUESADA LM, GOLDMAN GH, TAYLOR JW, RESTREPO A, MCEWEN JG. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol**, v.44, p.2153-7, 2006.

McVEIGH, I. & MORTON, K. Nutricional studies of *H. capsulatum*. **Mycopathology** 25: 294-308, 1965.

MENDES-GIANNINI, M.J.; HANNA, S.A.; MONTEIRO DA SILVA, J.L.; ANDREOTTI, P.F.; VINCENZI, L.R.; BENARD, G.; LENZI H.L.; SOARES, C.P. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. **Microbes Infect.** 6(10):882-91, 2004.

MENDES-GIANNINI, M.J.; SOARES, C.P.; DA SILVA, J.F.; ANDREOTTI, P. F. Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 45(3):383-94, 2005.

MENDES-GIANNINI, M.J.; TAYLOR, M.L.; BOUCHARA, J.B.; BURGER, E.; CALICH, V.L.; ESCALANTE, E.D.; HANNA, S.A.; LENZI, H.L.; MACHADO, M.P.; MIYAJI, M.; MONTEIRO DA SILVA, J.L.; MOTA, E.M.; RESTREPO, A.; RESTREPO, S.; TRONCHIN, G.; VINCENZI, L.R.; XIDIEH, C.F.; ZENTENO, E. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Med Mycol.** Suppl 1:113-23, 2000.

MENDES-GIANNINI, M.J.S.; ANDREOTTI, P.F., VINCENZI, L.R., MONTEIRO DA SILVA, J.L.; LENZI, H.L.; BENARD, G.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.; GUEDES, H.L.M.; SOARES, C.P.; Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect.** 8(6):1550-9, 2006.

MONTEIRO DA SILVA, J. L.; ANDREOTTI, P. F.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com células endoteliais. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 26, n.2, p. 149-156, 2005.

MUNDODI, V., KUCKNOOR, A.S. & ALDERETE, J.F. Immunogenic and plasminogen-binding surface-associated alpha-enolase of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 76, 523–531, 2008.

NEUHOFF, V., AROLD, N., TAUBE, D., EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v.9,p.255-62, 1988.

NUNES, L.R.; COSTA DE OLIVEIRA, R., LEITE, D.B. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. 1: **Eukaryot Cell.**; 4(12):2115-28, 2005.

NYHUS, K.J.; JACOBSON, E.S. Oxy2 as a transcriptional activator gene for copper uptake in *Cryptococcus neoformans*. **Med Mycol** 42: 325–331, 2004.

OLIVEIRA, S. J. **Estudo epidemiológico da paracoccidioidomicose na região de Campinas e avaliação da resposta imune celular na paracoccidioidomicose-infecção e nas diferentes formas da doença.** 2003. 75p. Tese de Doutorado – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2003.

PALMEIRO, M.; CHERUBINI, K; YURGEL, L. S. Paracoccidioidomicose – Revisão da Literatura. **Scientia Medica**, Porto Alegre: PUCRS, v. 15, n. 4, out./dez, 2005.

PANCHOLI, V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci* 58, 902–920, 2001.

RAMANAN, N.; WANG, Y. A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. *Science*, 12; 288(5468):1062-4, 2000.

RATLEDGE, C & DOVER, L.G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 54:881-941, 2000.

RESS, E.M. & THIELE, D.J. From aging to virulence: forging connections through the study of copper homeostasis in eukaryotic microorganisms. *Curr Opin Microbiol*, 7(2):175-84, 2004

RESTREPO, A.; JIMÉNEZ, B. E. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* Yeast Phase in a Chemically Defined Culture Medium. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, 279-281, 1980.

ROSA E SILVA, L. K.; STAATS, C. C.; GOULART, L. S.; MORELLO, L. G.; FUNGARO, M. H. P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis, **Research in Microbiology**, 2008.

RUSTICI, G.; VAN BAKEL, H.; LACKNER, D.H.; HOLSTEGES, F.C.; WIJMENGA, C.; BÄHLER, J.; BRAZMA, A. Global transcriptional responses of fission and budding yeast to changes in copper and iron levels: a comparative study. **Genome Biology**, 8:R73, 2007.

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

SAMPERMANS, S., MORTIER, J., AND SOARES, E.V. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of nutrients. **J Appl Microbiol** 98: 525–531. 2005.

LUDIN, K.M.; HILTI, N.; SCHWEINGRUBER, M.E. *Schizosaccharomyces pombe* rds1, an adenine-repressible gene regulated by glucose, ammonium, phosphate, carbon dioxide and temperature. **Mol Gen Genet.** 30;248(4):439-45, 1995.

SI, Y.; YUAN, F.; CHANG, H.; LIU, X.; LI, H.; CAI, K.; XU, Z.; HUANG, Q.; BEI, W.; CHEN, H. Contribution of glutamine synthetase to the virulence of streptococcus suis serotype 2. **Vet. Microbiol.** 2009.

SILVA, JF. **Estudo de diferentes isolados de Paracoccidioides brasiliensis quanto ao padrão de adesão e expressão de ligantes da matriz extracelular.** 63f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

SKAAR EP, HUMAYUN M, BAE T, DEBORD KL, SCHNEEWIND O. Ironsource preference of Staphylococcus aureus infections. **Science**, 305: 1626–1628, 2004.

SUNDSTROM, P.; CUTLER, J.E.; STAAB, J.F. Reevaluation of the role of HWP1 in systemic candidiasis by use of *Candida albicans* strains with selectable marker URA3 targeted to the ENO1 locus. **Infect Immun**, 70: 3281-3283, 2002.

TAMURA, G.S., NITTAYAJARN, A., SCHOENTAG, D.L. A glutamine transport gene, *glnQ*, is required for fibronectin adherence and virulence of group B streptococci. **Infection and Immunity**, 70, 2877–2885, 2002.

TOMAZETT, P.K.; CRUZ, A.H.; BONFIM, S.M.; SOARES, C.M.; PEREIRA, M. The cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*: insights from its transcriptome. **Genet Mol Res**, 30;4(2):309-25, 2005.

TULLIUS, M.V., HARTH, G., HORWITZ, M.A. Glutamine synthetase *GlnA1* is essential for growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human THP-1 macrophages and guinea pigs. **Infection and Immunity**, 71, 3927–3936, 2003.

V. DUTRA, L. NAKAZATO, L. BROETTO, I.S. SCHRANK, M.H. VAINSTEIN, A. SCHRANK. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. **Res. Microbiol**, 155 245-251, 2004.

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 gp 43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1465-1469, 1994.

WALTON, F.J., IDNURM, A., AND HEITMAN, J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol** 57: 1381–1396, 2005.

WANDERSMAN, C & DELEPELAIRE, P. Bacterial iron sources: From siderophores to hemophores. **Annu Rev Microbiol**, 58: 611–647, 2004.

WATERMAN, S.R.; HACHAM, M.; HU, G.; ZHU, X.; PARK, Y.D.; SHIN, S.; PANEPINTO, J.; VALYI-NAGY, T.; BEAM, C.; HUSAIN, S.; SINGH, N.; WILLIAMSON, P.R. Role of a CUF1/CTR4 copper regulatory axis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest*. 117(3):794-802, 2007.

X. HUANG, A. MADAN, CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res.**, 9, 868-877, 1999.

YAMAMATO, M.; WAKATSUKI, T.; HADA A.; RYO, A. Use of serial analyses of gene expression (SAGE). **J. Immunol. Methods**, v. 250, p. 45-66, 2001.

ZHAO, X.; OH, S.H.; CHENG, G.; GREEN, C.B.; NUESSEN, J.A.; YEATER, K.; LENG, R.P.; BROWN, A.J.; HOYER, L.L. ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin: functional comparisons between Als3p and Als1p. **Microbiology**; 15: 2415-2428. 2004.