



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**

**PERFIL TRANSCRICIONAL DO FUNGO PATOGENICO
Paracoccidioides brasiliensis EM RESPOSTA A
SULFAMETOXAZOL**

AMANDA GREGORIM FERNANDES

**Goiânia-GO
2011**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Amanda Gregorim Fernandes

3. Título do trabalho

Perfil transcricional do fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis* em resposta a sulfametoxazol.

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Maristela Pereira, Professor do Magistério Superior**, em 19/12/2023, às 10:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Gregorim Fernandes, Usuário Externo**, em 16/12/2025, às 15:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4275947** e o código CRC **24364BB1**.

AMANDA GREGORIM FERNANDES

**PERFIL TRANSCRICIONAL DO FUNGO PATOGENICO
Paracoccidioides brasiliensis EM RESPOSTA A
SULFAMETOXAZOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Biologia.

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular
Orientadora: Profa. Dra. Maristela Pereira

**Goiânia-GO
2011**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Fernandes, Amanda Gregorim
Perfil transcricional do fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis*
em resposta a sulfametoxazol [Manuscrito] / Amanda Gregorim Fernandes. - 2011.
93 f.: 2011

Orientadora: Prof(a). Dra. Maristela Pereira
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas,
Goiânia, 2011.

Bibliografia.
Inclui: siglas, símbolos, lista de figuras.

1. *Paracoccidioides*. 2. Transcriptoma. 3. Análise da Diferença
Representacional. 4. Antifúngico. 5. Sulfametoxazol.

I. Pereira, Maristela, orient. II. Título.

CDU 57



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO
Nº 376

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO – Aos vinte e seis dias do mês de agosto do ano de 2011 (26/08/2011), às 14h00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Prof.^a Dra. Maristela Pereira; Prof. Dr. Clayton Luiz Borges e Prof.^a Dra. Célia Maria de Almeida Soares, para sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada na Sala 13 do Instituto de Ciências Biológicas IV, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: “ **PERFIL TRANSCRICIONAL DO FUNGO PATOGÊNICO *Paracoccidioides brasiliensis* EM RESPOSTA A SULFAMETOXAZOL.**” em nível de mestrado, de autoria de AMANDA GREGORIM FERNANDES, discente do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente da banca examinadora Prof.^a Dra. Maristela Pereira que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra a seguir foi concedida à autora da dissertação que, em 40 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca argüiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de argüição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 572/2002 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia e procedidas às correções recomendadas, a Dissertação foi aprovada por unanimidade, considerando-se integralmente cumprido o requisito para fins de obtenção do título de MESTRE EM BIOLOGIA, na área de concentração em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretária do PPGB da versão definitiva da dissertação, com as devidas correções. A banca examinadora recomenda a publicação de artigo(s)

científico (s) oriundo(s) dessa dissertação em periódicos de circulação nacional e, ou, internacional, depois de procedidas as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17:00 horas a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação de Mestrado e para constar eu, Gleizilene Braz Pereira dos Santos, secretária do PPGB lavrei a presente Ata, que após lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em três vias de igual teor.


Prof.^a Dra. Maristela Pereira
Presidente da Banca
Universidade Federal de Goiás


Prof. Dr. Clayton Luiz Borges
Universidade Federal de Goiás


Prof.^a Dra. Célia Maria de Almeida Soares
Universidade Federal de Goiás

“Dissertação desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Biologia Celular e Molecular.”

Apoio Financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

Profa. Dra. Maristela Pereira – Orientadora

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dr. Clayton Luiz Borges

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

SUPLENTES

Prof. Dr. Sinji Borges Ferreira Tauhata

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

Dra. Patrícia Fernanda Zambuzzi Carvalho

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

“Às vezes, nossos sonhos caem no chão
Como pedacinhos de estrelas que pouco a pouco se apagam
Nosso coração chora em silêncio,
E quando as lágrimas caem, gelam todo o corpo
E o coração de tanto amar se converte em gelo
Para não sofrer mais, para já não chorar,
Mas se voltar ao céu,
Dar-se-ás conta que tem milhões de estrelas
E cada uma é um sonho por cumprir,
E a força em seu interior,
Derreterá o gelo em seu coração.
Só nunca deixe de acreditar,
Porque o amor
E teus sonhos
São a única porta para a eternidade.”
(Dulce María)

À minha amada irmã Andreia Gregorim Fernandes,
Minha boneca e hoje meu anjo,
Amiga, confidente, conselheira.

“Se passa o dia, o tempo e conto as horas, e eu sem perceber
Que estou parado vendo o seu retrato, e não vou mais te ver

E vou tentando aceitar...

Se a saudade aperta e eu não tenho nada a fazer,

Senão apenas chorar,

Não vou mais querer explicar, eu já sei,

Alguém me soprou, me falou tudo sobre você

E ainda eu vou te ver...”

Como agradecemos a Deus por tudo isso!
É Ele quem nos faz vitoriosos por meio de Jesus Cristo,
Nosso Senhor!
(I Corintios 15:57)
Aos meus pais,
Grácia Mary Gregorim Fernandes e
Wagner Gomes Fernandes
Pelo carinho, amor, confiança,
Dedicação e apoio incondicional.

À minha orientadora Profa. Dra. Maristela Pereira,
Exemplo de competência e dedicação,
Obrigada pela confiança, apoio, paciência e compreensão!
Enfim por tudo que você representa para mim!

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares, sua competência, dedicação e inteligência são meus exemplos a serem seguidos.

À Profa. Dra. Marize Campos Valadares Bozines, por abrir as portas de seu laboratório e estar sempre à disposição para a concretização desse trabalho.

À Dra. Patrícia Fernanda Zambuzzi Carvalho, por ser minha colaboradora, amiga, companheira e conselheira, por ter me orientado não só dentro do laboratório como para toda a vida!

Aos Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão, Dr. Clayton Luiz Silva Borges e Dra. Juliana Alves Parente por estarem sempre dispostos a me ajudar e discutir problemas. Obrigada por todo carinho e atenção!

Aos Prof. Dra. Silvia Maria Salem Isacc e Dr. Sinji Tauhata por terem participado da minha formação.

Ao Mcs. Flávio Silva de Carvalho por ter me guiado e orientado na realização de experimentos. Sua ajuda foi imprescindível!

Aos alunos Benedito Rodrigues e Kelly que muito me ajudaram no início do meu trabalho, sanando minhas dúvidas e ajudando no que foi preciso.

À amiga Priscila Elias, a faculdade e o laboratório não seriam os mesmos sem você. Obrigada por ter muito me ajudado em todos os aspectos da minha vida!

Às amigas e companheiras de laboratório Renata Silva do Prado Vilar, Symone Vitoriano e Karine Oliveira, a companhia e o enorme carinho foram essenciais na realização desse trabalho.

As amigas Patrícia Kott e Mariana Tomazett, flores, por estarem sempre presentes.

Aos amigos Leandro e Dayane, pelo carinho dispensado e por sempre me ouvirem quando precisei.

Aos companheiros do Laboratório de Biologia Molecular: Daciene, Ronney, Patrícia Lima, Elisa Flávia, Mirelle, Hellen, Ana Flávia, Cristina, Simone Weber, Sheyla, Fabiana, Luciana, Luciene, Luciane, Laurine, Edilânia, Laura, Romeu, Nayche, Camila, Artur e todos aqueles que comigo conviveram dentro do laboratório, obrigada pela ajuda, pelo companheirismo e pelo sorriso sempre oferecidos. Vocês tornaram meus dias mais felizes!

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia pela oportunidade do aprendizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Goiás, por possibilitar essa etapa.

A todos os meus familiares e amigos externos ao laboratório que estiveram sempre presentes e de alguma forma contribuíram para mais essa conquista! Vocês são muito importantes na minha vida! Amo muito vocês!

SUMÁRIO

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	1
RESUMO.....	4
ABSTRACT	6
1 - INTRODUÇÃO.....	8
1.1 - Caracterização da paracoccidiodomicose	8
1.2 - O fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	10
1.3 - Abordagens terapêuticas e mecanismos de ação dos antifúngicos	13
1.4 - Aspectos gerais do composto sulfametoxazol.....	17
1.5 - Transcritomas de <i>P. brasiliensis</i>	20
1.6 - Utilizações da genômica na elucidação de mecanismos de ação de antifúngicos e na identificação de novos alvos para interferência	24
2 - JUSTIFICATIVA.....	27
3 - OBJETIVOS.....	28
3.1 - Geral.....	28
3.2 - Específicos	28
Manuscrito.....	29
Abstract.....	30
Introduction	31
Materials and Methods.....	33
Results.....	39
Discussion.....	43
Figure Legends	51
References.....	53
Figures and Tables	71

4 - PERSPECTIVAS	81
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural do sulfametoxazol	18
Figura 2 – Reação esquemática da via de biossíntese de cofatores folatos	19

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

°C – graus Celsius

5-FC: 5-fluorocitosina

µg - micrograma

µL - microlitro

AAC – ADP/ATP transportador

ACAD – Acil-CoA desidrogenase

COQ3 – 3-demetilubiquinona-9 3-metiltransferase

ACR1 – succinato/fumarato transportador mitocondrial

ACUH – carnitina/acil carnitina transportador

AMP – Adenosina monofosfato

ATP – Adenosina trifosfato

ATP2 – ATP sintase subunidade beta

cDNA – DNA complementar

DHF – diidrofolato

DHFR – diidrofolato redutase

DHFS – diidrofolato sintase

DHP – diidropteroato

DHPPP – 2-amino-4-hidróxi-6-hidroximetil-7,8 diidropteridina pirofosfato

DHPS – diidropteroato sintase

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

ERG11 - Citocromo P-450 14- α -esterol demetilase

ESTs – Expressed Sequence Tags (etiquetas de sequências expressas)

FdUMP – 5-monofosfato de fluorodeoxiuridina

FURTP – trifosfato de 5-fluoruridina

FZO1 – Transmembrana GTPase

GLN1 – glutamina sintetase

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

ITS – Internally transcribed spacer (espaçador interno transcrito)

mg – miligrama

mL - mililitro

MMcM – meio McVeigh Morton

mRNA – ácido ribonucléico mensageiro

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

OYE – NADPH desidrogenase

PABA – Ácido *p*-aminobenzóico

PCM – Paracoccidioidomicose

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

PS – Espécie filogenética

qRT-PCR – PCR quantitativa em tempo real

RDA – Análise Diferencial Representacional

RENAME – Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

RNA – ácido ribonucleico

RPE1 – D- Ribulose 5-fosfato 3-epimerase

rpm – rotações por minuto

SCDA – Acil-CoA desidrogenase de cadeia curta

SFB – Soro fetal bovino

SMX – Sulfametoxazol

SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida

SUS – Sistema Único de Saúde

THF - tetraidrofolato

TMP-SMX – Trimetroprim-Sulfametoxazol

tRNA – ácido ribonucléico transportador

UBI – Ubiquitina

RESUMO

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma infecção sistêmica causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. Micélio e conídios crescem *in vitro* a 23°C-26°C e 18°C ± 4°C, respectivamente, e como saprófitas no solo, água e plantas à temperatura ambiente e são considerados as formas infectantes do fungo. A fase de levedura ocorre a 35°C-37°C *in vitro* e nos tecidos do hospedeiro. Sulfonamidas foram as primeiras drogas utilizadas no tratamento da PCM e continuam a ser um medicamento muito utilizado nos dias de hoje contra esta infecção fúngica. Sabe-se que as sulfas são antagonistas competitivos do ácido *p*-aminobenzóico (PABA), que condensa com 2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetil-7, 8 pirofosfato dihydropteridine (DHPPP) para formar dihydropteroate (DHP), uma reação catalisada pela dihydropteroato sintase (DHPS). No entanto, nenhum estudo foi realizado para células de *P. brasiliensis*. O objetivo deste trabalho foi investigar o mecanismo de ação global de sulfametoxazol em *P. brasiliensis*. Células leveduriformes foram cultivadas em meio mínimo, na presença e ausência de sulfametoxazol por 1 e 2 h, a 36°C. Após a extração de RNA total, o cDNA foi obtido e utilizado para os experimentos de análise da diferença representacional (RDA), a fim de identificar os genes reprimidos e induzidos nessa condição. Sequências de ESTs foram agrupadas usando o programa CAP3 e classificados de acordo com as funções usando o programa BLAT2GO. Vários transcritos relacionados com as funções mitocondriais foram diferencialmente expressos. Entre eles podem ser citados GTPase Transmembrana, transportador mitocondrial succinato/fumarato, 3-demetilubiquinona-9-metiltransferase, subunidade beta da ATP sintase, NADPH desidrogenase e transportador carnitina/acil-carnitina. Outros transcritos

relacionados ao metabolismo, e para funções desconhecidas foram induzidos e reprimidos. Com o objetivo de validar o RDA e os resultados de bioinformática, identificamos genes potencialmente relevantes e, em seguida, validamos pela análise de PCR em tempo real quantitativa (qRT-PCR). Além disso, para confirmar as alterações mitocondriais, foi realizado o método de redução do sal de tetrazólio 3-(4,5-dimetil-2-il)-2,5-brometo de difeniltertrazolim (MTT). Os resultados indicaram que sulfametoxazol atua em *P. brasiliensis* como um concorrente para a síntese de aminoácidos, ácidos nucléicos e biossíntese de precursores dos cofatores folatos, e ainda desestabilizando as funções mitocondriais.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; Transcriptoma; Análise da Diferença Representacional; Antifúngico; Sulfametoxazol.

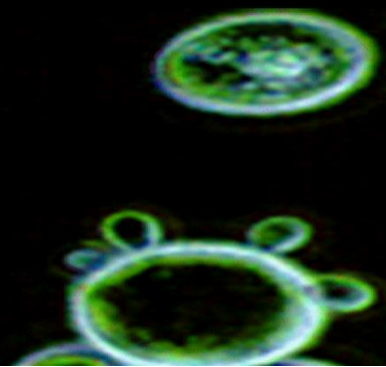
ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic fungal infection caused by thermo-dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Mycelia and conidia growing *in vitro* at 23°C-26°C and 18°C ± 4°C, respectively, and as saprophytes in soil, water and plants to room temperature are considered the infective forms of the fungus. The yeast phase occurs at 35°-37°C *in vitro* and host tissues. Sulfonamides were the first drugs used for treatment of PCM and continue to be quite active medications nowadays against this fungal infection. It is known that sulfa drugs are competitive antagonist of *p*-aminobenzoic acid (PABA), which condenses with 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7,8 dihydropteridine pyrophosphate (DHPPP) to form dihydropteroate (DHP), a reaction catalyzed by dihydropteroate synthase (DHPS). However, no study was realized to *P. brasiliensis* yet. The aim of this work was investigating the global mechanism of action of sulfamethoxazole on *P. brasiliensis*. Yeast cells were grown on minimum medium in the presence and absence of sulfamethoxazole for 1 and 2 h, at 36°C. After extraction of total RNA, the cDNA was obtained and used to representational difference analysis (RDA) experiments to identify the genes up and down regulated. ESTs sequences were clustering using the CAP3 program and classified in agreement with the functions by using BLAT2GO program. Several transcripts related to mitochondrial function were differentially expressed. Among them could be cited transmembrane GTPase, succinate/fumarate mitochondrial transporter, 3-demethylubiquinone-9-methyltransferase, ATP synthase subunit beta, NADPH dehydrogenase and carnitine/acyl carnitine carrier. Other transcripts related to metabolism, and to unknown functions were up or down regulated. Aiming to validate the RDA and bioinformatics results, we identified genes

potentially relevant and then validated by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Furthermore, to confirm the mitochondrial alteration, the method of reduction of tetrazolium salt 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). The results indicated that sulfamethoxazole acts in *P. brasiliensis* as a competitor for the synthesis of amino acids, nucleic acids and precursors of biosynthesis of folate cofactors, and then destabilizing mitochondrial functions.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*; Transcriptome; Representational Difference Analysis; Antifungal; Sulfamethoxazole.

Introdução



1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Paracoccidioidomicose

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica originalmente descrita por Adolfo Lutz 1908. A doença ocorre caracteristicamente em regiões rurais da América Latina, sendo o Brasil o país com o maior número de casos da doença. Acredita-se que 10 milhões de pessoas estejam infectadas por seu agente etiológico, o fungo patogênico humano *Paracoccidioides brasiliensis*, sendo que 2% deles podem desenvolver a PCM fatal aguda ou crônica (Brummer *et al.*, 1993). No Brasil, esta micose é responsável pela maioria dos casos de óbitos atribuídos às principais doenças fúngicas sistêmicas (Coutinho *et al.*, 2002; Prado *et al.*, 2009). A PCM crônica é caracterizada pelo envolvimento pulmonar, apresentando uma resposta inflamatória granulomatosa, a qual é uma defesa eficaz contra o fungo.

A doença pode apresentar um amplo espectro de manifestações clínicas e patológicas que vão desde manifestações assintomáticas a lesões pulmonares leves e infecções disseminadas graves, envolvendo vários órgãos, mais frequentemente pulmões, mucosas orofaríngeas, pele, linfonodos, glândulas supra-renais, e sistema nervoso central (Bertini *et al.*, 2007). A evolução da PCM depende de fatores relacionados ao indivíduo, tais como sexo, idade, estado nutricional e predisposição genética. A intensidade, disseminação e características das lesões dependem da virulência do fungo e de flutuações no mecanismo de defesa do hospedeiro (Franco *et al.*, 1993).

A infecção se inicia pela inalação de propágulos do fungo provenientes do micélio, os quais atingem o epitélio dos alvéolos pulmonares e se convertem na forma leveduriforme parasitária. Esse processo ocorre em aproximadamente 24

horas no sexo masculino e 96 horas no sexo feminino após a inalação pelo hospedeiro (Restrepo *et al.*, 2001), caracterizando o foco inflamatório (McEwen *et al.*, 1987). O passo inicial para a colonização de patógenos é a interação que ocorre entre o microrganismo e o tecido do hospedeiro, sendo crucial para o desenvolvimento da infecção. Essa adesão ocorre através do reconhecimento do patógeno à ligantes localizados na superfície de células do hospedeiro ou à constituintes de membrana basal como, fibrinogênio, laminina, colágeno ou fibronectina (Gonzalez *et al.*, 2005; da Silva Castro *et al.*, 2008).

A maioria dos casos de PCM ocorre nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, onde afeta principalmente indivíduos do sexo masculino em idade produtiva (30 a 60 anos de idade), estando relacionada com a agricultura. Este fato pode ser explicado pela ação protetora do hormônio estrógeno 17- β -estradiol que apresentou inibição, dose dependente, na transição de micélio para levedura *in vitro* (Restrepo *et al.*, 1984; Pinzan *et al.*, 2010). Atualmente tem sido descrito um aumento do número de mulheres desenvolvendo PCM, provavelmente devido ao crescimento desta mão de obra nas atividades rurais (Coutinho *et al.*, 2002).

Recidivas, complicações e sequelas anatômicas e funcionais ocorrem em pelo menos 20% dos pacientes, entre eles a temida fibrose pulmonar e subsequente insuficiência respiratória. Como observado em outras doenças negligenciadas, os pacientes com PCM possuem condições associadas que agravam sua saúde, como alcoolismo, tabagismo, desnutrição, tuberculose, neoplasias e SIDA (síndrome da imunodeficiência adquirida) (Morejon *et al.*, 2009). Nos últimos anos, a PCM tem sido apontada como uma doença oportunista quando associada à pacientes com SIDA; a mortalidade entre esses pacientes tem sido considerada alta (Paniago *et al.*, 2005; Silva-Vergara *et al.*, 2003).

Em um estudo realizado com prontuários de pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) inscritos nas unidades especializadas de Cuiabá, Mato Grosso, no período de 2005-2008, foi constatado que 175 possuíam infecções fúngicas de qualquer natureza. Micose sistêmica foi constatada em 60 desses pacientes, sendo 37 (61,7%) do sexo masculino e 23 (38,3%) do sexo feminino. A idade desses pacientes variou de 11 a 59 anos. Destacaram-se pacientes com mais de 30 dias de início de sintomas (67,2%), baixo nível de escolaridade (85,6%), referindo uso frequente de bebidas alcoólicas (67,3%) e hábito de fumar cigarros (74,5%) (Ribeiro *et al.*, 2009).

Vários relatos enfatizam as dificuldades no diagnóstico da PCM em pacientes com SIDA (Valera *et al.*, 2008). Devido à imunossupressão causada pela infecção por HIV, o paciente se torna mais suscetível à certas doenças, tais como infecções, neoplasias, e a associação entre elas (Pontes *et al.*, 2011).

Cerca de 100 anos após a descoberta da doença causada pelo *P. brasiliensis*, ainda há a necessidade de implantação de um programa eficaz e permanente para a sua prevenção e diagnóstico, e para o fornecimento de antifúngicos e assistência aos pacientes com complicações e sequelas. O fato de que a notificação de casos da doença não é obrigatória é talvez a principal razão da PCM ser negligenciada no planejamento da saúde pública no Brasil (Martinez, 2010).

1.2 - O fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

P. brasiliensis é um fungo termodimórfico que cresce como micélio e levedura. A fase miceliana se desenvolve na natureza e *in vitro* a 23°-26°C. Micélios e conídios provavelmente podem crescer saprofiticamente no solo, na água, e em plantas à

temperatura ambiente, sendo consideradas as formas infectivas do fungo (Restrepo *et al.*, 2001; Restrepo, 1985). A fase leveduriforme ocorre à 35°-37°C *in vitro* e nos tecidos do hospedeiro (Bagagli *et al.*, 2006). O aspecto mais característico da aparência leveduriforme são os múltiplos brotamentos das células mães, rodeadas por várias células filhas periféricas, constituindo a estrutura denominada roda de leme (Furtado *et al.*, 1967). A forma miceliana é caracterizada por filamentos septados com conídios terminais ou intercalares (Restrepo-Moreno, 2003; Queiroz-Telles, 1994).

O processo dimórfico de fungos é uma adaptação às condições ambientais. Em *P. brasiliensis* a conversão para a fase de levedura é um requisito para a progressão da infecção (San-Blas & Niño-Vega 2008). Além disso, o dimorfismo é um mecanismo de defesa importante para a adaptação de alguns fungos patogênicos às condições adversas do hospedeiro humano durante o estabelecimento da doença e invasão dos tecidos (Kurokawa *et al.*, 1998; San-Blas *et al.*, 2002; Nemecek *et al.*, 2006). Acredita-se que a morfogênese esteja associada à virulência do fungo, pois isolados que não possuem a capacidade de se diferenciar em leveduras não são virulentos (De Moraes Borba & Schaffer 2002). Villar e colaboradores observaram que o dimorfismo em *P. brasiliensis* pode também estar associado a fatores nutricionais. A adição de soro fetal bovino (SFB) ao meio de cultura complexo e quimicamente definido permitiu a formação de células semelhantes à levedura, a 25°C, denominadas YRT. Este fato demonstra que o dimorfismo de *P. brasiliensis* depende da alteração de temperatura e/ou favorecimento de nutrientes (Villar *et al.*, 1988).

Em regiões endêmicas, tem sido observada a infecção natural do fungo em alguns animais silvestres, como tatus (*Dasybus novemcinctus*, *Dasybus septemcinctus* e *Dasybus centralis*), e animais domésticos, como cachorro (*Canis familiaris*). Cabe ressaltar que esses animais devem ser considerados hospedeiros acidentais e não reservatórios naturais do fungo, pois os mesmos podem ser acometidos pela doença (Conti-Diaz, 2007). A identificação de *P. brasiliensis* tem sido obtida através de *Nested-PCR* (reação em cadeia da polimerase) com oligonucleotídeos ITS do fungo, em animais selvagens mortos encontrados em estradas e rodovias. Dessa forma, a presença do fungo em tatu (*Dasybus sp.*), porco da índia (*Cavia aperea*), porco espinho (*Sphigurrus spinosus*), guaxinim (*Procyon cancrivorus*) e furão (*Gallictis vittata*) tem sido detectada (Richini-Pereira *et al.*, 2008). *P. brasiliensis* também já foi recuperado a partir de fezes de pinguim e morcegos frugívoros (Grose & Tamsitt 1965). A presença de *P. brasiliensis* em primatas tem sido demonstrada com a utilização de testes sorológicos ou intradérmicos (Johnson & Lang 1977; Corte *et al.*, 2007). Nenhuma correlação foi encontrada até o momento entre os diferentes isolados filogenéticos de *P. brasiliensis* e o nicho ecológico do fungo, ou a apresentação clínica da PCM (Matute *et al.*, 2006; Carrero *et al.*, 2008; Bagagli *et al.*, 2008).

Em sua classificação, o *P. brasiliensis* é descrito como pertencente ao Reino: *Fungi*; Filo ou Divisão: *Ascomycota*; Subdivisão: *Euascomycotina*; Classe: *Plectomyceto*; Sub-classe: *Euascomycetidae*; Ordem: *Onygenales*; Família: *Onygenaceae*; Sub-família: *Onygenaceae* anamórficos; Gênero: *Paracoccidioides*; Espécie: *brasiliensis* (San-Blas *et al.*, 2002). No entanto, existem três grupos distintos de *P. brasiliensis*, S1, PS2 e PS3, todos identificados através de dados de polimorfismo genéticos. A espécie filogenética S1 distribui-se no Brasil, Argentina,

Paraguai, Peru e Venezuela, enquanto PS2 foi encontrado apenas no Brasil e na Venezuela e PS3 encontra-se restrito à Colômbia. Todas as três espécies foram capazes de induzir a doença em hospedeiros humanos e animais, entretanto, uma menor virulência tem sido observada nas espécies PS2 (Matute *et al.*, 2006).

Em análises filogenéticas de 21 isolados de *P. brasiliensis*, realizadas por Carrero *et al.* (2008), verificou-se a distinção do isolado *Pb01* de outros analisados, que se apresentaram agrupados segundo a região geográfica das quais foram obtidos, enquanto *Pb01* estava agrupado com o isolado IFM 54648, obtido a partir de um paciente do estado do Paraná. Em um estudo posterior, análises filogenéticas de 82 isolados de *P. brasiliensis* foram realizadas por Teixeira *et al.*, (2009). Baseado em dados moleculares, nos caracteres morfológicos exclusivos analisados e possivelmente um longo período de isolamento genético, foi proposto a descrição formal de uma nova espécie dentro do gênero *Paracoccidioides*, contemplando o isolado *Pb01*. Essa espécie é altamente divergente das três espécies identificadas até agora (PS2, PS3 e S1) descritas por Matute *et al.* (2006).

1.3 - Abordagens terapêuticas e mecanismos de ação dos antifúngicos

As infecções fúngicas sistêmicas têm aumentado de forma considerável nas últimas décadas. Os principais fatores de risco que têm contribuído para este problema são: (i) o incremento do número de procedimentos cirúrgicos e técnicas invasivas (cateteres centrais, nutrição parentérica), (ii) o aumento de doentes submetidos a tratamentos de quimioterapia, (iii) terapêutica com fármacos imunossupressores utilizados nos transplantes de órgãos, (iv) quadros patológicos de imunossupressão como a síndrome da imunodeficiência adquirida SIDA, (v) e a

prescrição de antibióticos de largo espectro (fator de risco acrescido devido à redução da microbiota protetora, levando ao crescimento de fungos que colonizam o paciente) (Grau & Mateu-De Antonio 2003).

Até 1940, poucos fármacos estavam disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. A sulfonamida foi a primeira droga empregada para o tratamento da PCM na década de 40 (Del Negro, 1982). O aparecimento dos polienos antifúngicos representou o maior avanço na micologia médica; a anfotericina B rapidamente se tornou a terapêutica de primeira linha para infecções graves; no entanto possuía efeitos secundários, dose dependente, associados à perfusão e nefrotoxicidade (Maertens, 2004). Em algumas décadas posteriores, as pesquisas para novos antifúngicos menos tóxicos levou à descoberta dos azóis. Nos anos 80, surgiu a primeira geração de triazóis, o que constituiu o segundo maior avanço no tratamento de infecções fúngicas. Inicialmente foi lançado o cetoconazol, e posteriormente o fluconazol e itraconazol, estes últimos com um melhor perfil de segurança relativamente à anfotericina B e ao cetoconazol (Terrell, 1999). O seu uso generalizado levou ao desenvolvimento de resistências, e ainda, o uso de interações medicamentosas impôs algumas limitações na sua utilização. Nos anos 90, surgiram as formulações lipídicas de anfotericina B (lisossômica, complexo lipídico e dispersão coloidal) a qual apresentou uma redução na nefrotoxicidade, entretanto, o custo terapêutico ainda é muito elevado (Dupont, 2002).

Na escolha do melhor medicamento para o tratamento da PCM, tradicionalmente, são analisados o tempo de administração do medicamento, a severidade da doença, o local da lesão e as contraindicações baseadas em histórico prévio de falhas ou reação de hipersensibilidade (Yasuda, 2005). No entanto, medidas gerais envolvendo o combate à má nutrição, depressão imunológica, e o

processo infeccioso, são indispensáveis, uma vez que estes fatores, somados, favorecem a instalação da micose (Mendes-Giannini *et al.*, 2004).

Os medicamentos clássicos utilizados para o tratamento da PCM ainda são sulfonamidas, anfotericina B, e derivados imidazólicos, tais como cetoconazol, itraconazol, e fluconazol (Travassos *et al.*, 2008; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Rivitti & Aoki 1999; Queiroz-Telles, 1994).

A anfotericina B (2 mg/kg/dia) é um antifúngico poliênico com espectro de atividade muito amplo, por isso é indicada para os casos severos e disseminados e deve ser seguido por um tratamento prolongado com compostos azoles e/ou sulfametoxazol (Brummer *et al.*, 1993). A anfotericina B atua principalmente por união ao ergosterol, componente biorregulador da fluidez e da assimetria fosfolipídica da membrana celular fúngica. Esse composto produz poros aquosos que acarretam a morte celular através da desestabilização na membrana plasmática seguida por alterações de permeabilidade e extravasamento de componentes citoplasmáticos vitais (Ghannoum & Rice 1999).

Os azólicos (fluconazol, itraconazol, cetoconazol, saperconazol e voriconazol) interferem na biossíntese do ergosterol, atingindo a enzima citocromo P-450 14- α -esterol demetilase (ERG11), a qual é essencial para a síntese do ergosterol, se ligando ao grupo heme no sítio ativo da enzima (Sanglard, 2002; Kelly *et al.*, 1993). A inibição da 14- α -lanosterol demetilase leva à depleção do ergosterol e acúmulo de esteróis precursores, resultando na formação de uma membrana plasmática com função e estrutura deficientes (Ghannoum & Rice 1999).

O itraconazol é uma opção terapêutica que permite o controle das formas leves e moderadas da doença em menor período. Entretanto, considerando que o medicamento não está disponível na rede pública da maioria dos Estados, a

combinação trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX) é a alternativa mais utilizada na terapêutica ambulatorial dos pacientes com PCM. Pacientes com formas graves, necessitando internação hospitalar, devem receber anfotericina B ou TMP-SMX por via intravenosa (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

As sulfonamidas são medicamentos com apresentação na forma de xarope, por isso são a escolha para o tratamento da PCM em crianças (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006) e apesar de possuírem um valor acessível ao paciente e de serem eficazes no tratamento da doença, sua utilização requer um longo período de tempo, o que leva, na maioria das vezes, à desistência dos pacientes na continuidade do tratamento (San-Blas & Niño-Vega 2008).

A 5-fluorocitosina (5-FC) é a única representante da classe das pirimidinas. Este agente, após uma reação de desaminação na célula fúngica, é convertido em duas formas ativas 5-monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP) e trifosfato de 5-fluoruridina (FURTP). O FdUMP é um potente inibidor da timidilato sintetase, enzima responsável pela síntese de DNA fúngico. Já o FURTP, quando é incorporado ao RNA fúngico no lugar do ácido uridílico, causa alteração na aminoacilação do tRNA *in vitro* e desequilíbrio de todos os RNAs internos bem como prejuízo na síntese de proteínas e carboidratos (Waldorf & Polak 1983).

A mais nova classe de agentes antifúngicos é representada pelas equinocandinas, que são constituídas de lipopeptídeos derivados de produtos naturais de fermentação fúngica. Essa classe atua inibindo a 1,3- β -glucanase sintetase, enzima responsável pela síntese da 1,3- β -glucana, componente da parede celular fúngica. Devido a esse distinto modo de ação, evidenciam toxicidade seletiva frente a células fúngicas devido à ausência do polissacarídeo de glucana nas células de mamíferos (Arikan *et al.*, 2005).

Diferente de outros fungos patogênicos, *P. brasiliensis* é fungo sensível à maioria das drogas antifúngicas, inclusive aos sulfamídicos (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Entretanto, estudos *in vitro* mostraram a resistência de *P. brasiliensis* à sulfonamidas, azoles e anfotericina B (Da Lacaz *et al.*, 1959; Restrepo & Tabares Cde 1984). A resistência ao cetoconazol, TMP-SMX também foi descrita em isolados de pacientes que apresentavam falhas ao tratamento com combinação de drogas (Yasuda, 2005).

A terapia em longo prazo é geralmente necessária para garantir uma boa resposta clínica e evitar recaídas. No entanto, o tratamento tem suas limitações como a alta toxicidade, baixa eficiência e resistência aos medicamentos, principalmente devido ao número crescente de pacientes imunocomprometidos. Assim, apesar de existir drogas antifúngicas para o tratamento de pacientes com PCM, há uma demanda por novas intervenções terapêuticas (Ribeiro *et al.*, 2010). Mesmo o antimetabólito 5-FC e o novo antifúngico da classe das equinocandinas têm sido utilizados com moderação, devido ao alto índice de isolados resistentes e ao limitado espectro de atuação (Krcmery, 2005). A suscetibilidade de *P. brasiliensis*, a esse medicamento parece estar correlacionada ao isolado do fungo (San-Blas & Niño-Vega 2008). *P. brasiliensis* apresentou-se resistente à ação de micafungina (Nakai *et al.*, 2003). Desta forma, torna-se relevante a necessidade de pesquisa e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

1.4 - Aspectos gerais do composto sulfametoxazol

Sulfametoxazol (Figura 1) é um antimicrobiano bacteriostático largamente utilizado na medicina humana e veterinária (Yang *et al.* 2005), sendo disponível no

Sistema Único de Saúde (SUS), visto que está presente na RENAME (Relação Nacional de Medicamentos Essenciais).

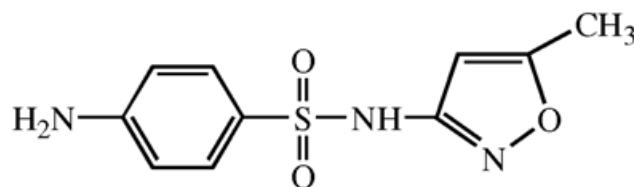


Figura 1 - Fórmula estrutural do sulfametoxazol

O sulfametoxazol pertence à família das sulfonamidas, as quais competem com o ácido *p*-aminobenzóico (PABA) impedindo parcialmente a síntese do ácido fólico em bactérias (Lindsey *et al.*, 2001) (Figura 2). A competição se deve ao fato de que as sulfonamidas são análogos estruturais do PABA, os quais apresentam propriedades estéricas e eletrônicas semelhantes. A diferença principal entre o PABA e as sulfonamidas consiste na presença de um ácido carboxílico e um grupo sulfona ligados ao carbono 1, respectivamente. Para muitos micro-organismos, o PABA é um metabólito essencial. A reação de condensação da DHPPP com o PABA envolve adenosina-trifosfato (ATP), a qual produz DHP que é subsequentemente convertido em ácido fólico. O qual é um importante precursor da síntese de ácidos nucléicos (Petri, 2001).

Na via de biossíntese de cofatores folato, a qual ocorre somente em micro-organismos e plantas, o PABA se condensa com 2-amino-4-hidróxi-6-hidroximetil-7,8 diidropteridina pirofosfato (DHPPP), a reação é catalisada pela diidropteroato-sintase (DHPS) para formar diidropteroato (DHP). DHP é o substrato para a diidrofolato-sintase (DHFS), a qual adiciona glutamato para a produção de diidrofolato (DHF). DHF é então reduzido pela enzima diidrofolato-redutase (DHFR) para produzir

tetraidrofolato (THF). THF e seus derivados são usados como cofatores em várias reações biossintéticas como síntese de aminoácidos, como metionina, serina, glicina e histidina, e ainda purinas e timidilato (Patel *et al.*, 2004).

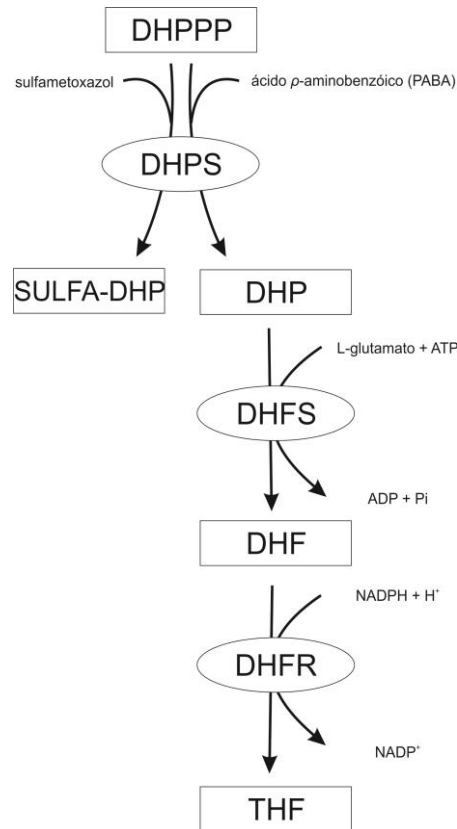


Figura 2 – Reação esquemática da via de biossíntese de cofatores folatos

A ligação das sulfonamidas com a enzima DHPS leva à formação de análogos não funcionais do ácido fólico, impedindo o crescimento da célula bacteriana, o que pode ser contrabalançado por um excesso de PABA no ambiente (inibição competitiva). As células animais são incapazes de sintetizar o ácido fólico dependendo assim, de fontes exógenas. Muitas bactérias são sensíveis à ação das sulfonamidas. Todavia algumas bactérias, a exemplo das células animais, não são inibidas pelas sulfonamidas (Petri, 2001).

A sulfonamida pode ser administrada via oral, intravenosa e intramuscular (Mendes *et al.*, 1994), podendo ser administrada sozinha ou na combinação TMP-SMX. As sulfonamidas são indicadas para pacientes com restrição à anfotericina B e aos imidazóis, e em pacientes que apresentam cardiopatia ou hepatopatia e com restrição de idade (Dillon *et al.*, 1986).

A introdução do Trimetoprim-Sulfametoxazol (TMP-SMX) foi um avanço no desenvolvimento de agentes antimicrobianos de eficiência clínica, resultando em um sinergismo de efeito. Trata-se de um poderoso inibidor competitivo e seletivo da DHFR, visto que o THF é necessário nas reações de transferência de um carbono, a administração de TMP-SMX introduz bloqueios sequenciais na via de síntese do THF do micro-organismo a partir de moléculas precursoras (Stevens & Vo, 1982; Goodman, 1996).

1.5 - Transcritomas de *P. brasiliensis*

Muitos trabalhos têm descrito o perfil de expressão gênica de *P. brasiliensis* sob certas condições, com a finalidade de compreender a sua biologia.

Muitos genes de *P. brasiliensis*, isolado *Pb01*, que codificam proteínas indispensáveis para a interação parasito-hospedeiro foram estudados, elucidando os mecanismos usados para sobrevivência, resistência e crescimento do fungo. Nesses trabalhos foram encontrados transcritos, diferencialmente expressos envolvidos com várias vias metabólicas, como captação e transporte de metais (ferro, cobre e zinco) e síntese de fatores de virulência (melanina e seus precursores) (Bailão *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2007; da Silva *et al.*, 2006; Hamilton & Gomez 2002; Ratledge & Dover 2000; Taborda *et al.* 2008).

No estudo onde queratinócitos foram infectados por leveduras de *P. brasiliensis*, isolado *Pb01*, a expressão diferencial de mRNAs e proteínas foi avaliada, a fim de caracterizar genes e proteínas diferencialmente expressos durante a infecção. Entre os transcritos encontrados incluem indutores de citocinas, metabolismo de proteínas, metabolismo alternativo de carbono, transportadores de zinco e de resposta a estresse durante o contato com queratinócitos. Esses transcritos mostraram que apesar de estar em uma situação de estresse as células continuavam proliferando e metabolicamente ativas. Além disso, as vias metabólicas foram sendo ativadas a fim de eliminar as substâncias tóxicas da célula (transportador de zinco), este último, em conjunto com a glicosamina-6-fosfato isomerase e outras proteínas dessa via (Peres da Silva *et al.* 2011).

O genoma funcional e diferencial de micélio e levedura de *P. brasiliensis*, isolado *Pb01* (Felipe *et al.* 2005) permitiu a identificação de 6.022 grupos de ESTs, representando cerca de 80% do genoma estimado para esse fungo, baseado no estudo de densidade gênica feito por Reinoso *et al.* (2005). Em geral, o padrão dos genes que são super expressos na fase miceliana sugere que esta forma possua metabolismo aeróbico, ao contrário da forma leveduriforme, possuindo metabolismo anaeróbico (Felipe *et al.*, 2005).

O perfil transcricional de *P. brasiliensis*, isolado *Pb01*, foi analisado durante a diferenciação morfológica de micélio para levedura. Neste trabalho foi avaliada a expressão de 1.107 transcritos obtidos a partir de biblioteca de cDNA após 22 horas de indução da transição de micélio para levedura. De acordo com o perfil transcricional encontrado, foi proposto que o remodelamento da parede celular ocorra nos estágios iniciais da transição. Foram encontrados transcritos relacionados ao ciclo do glioxalato, tais como isocitrato liase, malato desidrogenase,

citrate sintase e aconitase sugerindo que esta via seja funcional durante a transição dimórfica. Em adição, genes relacionados às vias de transdução de sinal apresentaram níveis de expressão aumentados, sugerindo o controle de genes na adaptação e sobrevivência do fungo durante os estágios iniciais da transição (Bastos *et al.*, 2007).

Marques e colaboradores utilizaram a técnica de Hibridização Subtrativa por Supressão (SSH) e análises de microarranjos para identificar genes que são preferencialmente expressos na fase leveduriforme de *P. brasiliensis*, isolado *Pb18*, quando comparado com a fase miceliana. Os genes identificados mais expressos na fase leveduriforme estão envolvidos em metabolismo básico, transdução de sinal, crescimento e morfogênese e metabolismo de enxofre (Marques *et al.*, 2004).

Com o objetivo de identificar as respostas adaptativas de *P. brasiliensis*, isolado *Pb01*, durante a infecção, Bailão *et al.* (2006) utilizaram a técnica de RDA (Análise Diferencial Representacional) para analisar células leveduriformes de *P. brasiliensis*, provenientes de modelo animal, após infecção, e células leveduriformes do fungo incubado com sangue humano. Genes relacionados à aquisição de ferro, síntese de melanina e defesa celular foram especialmente induzidas no modelo animal de infecção. Os transcritos induzidos nas células de levedura durante a incubação com sangue humano foram aqueles predominantemente relacionados com a remodelação da parede celular/síntese.

Em análises do perfil transcricional de células leveduriformes de *P. brasiliensis*, isolado *Pb01*, após incubação com plasma humano foi possível detectar a super expressão de genes relacionados à degradação de ácidos graxos, síntese de proteínas, resposta celular à mudança de osmolaridade do meio, remodelamento celular e defesa (Bailão *et al.*, 2007).

Costa e colaboradores realizaram a análise do transcriptoma de leveduras de *P. brasiliensis*, isolado *Pb01*, durante o processo infectivo a fim de identificar as alterações na expressão gênica do fungo durante esse processo. Um total de 4.934 ESTs provenientes de fígado de camundongo infectado foi sequenciado e anotado. Foram encontrados genes envolvidos no metabolismo anaeróbico da glicose, e alguns responsáveis pelo metabolismo de lipídios. Em uma análise comparativa entre os bancos de dados de células leveduriformes e transcriptomas de micélio com o banco gerado através desse trabalho conseguiu descobrir genes diferencialmente expressos em resposta ao hospedeiro (Costa *et al.*, 2007).

Borges e colaboradores utilizando a técnica do RDA entre os isolados *Pb01* e *Pb4940*, este último não sendo capaz de transitar para levedura, demonstrou que durante essa fase de levedura alguns genes induzidos eram relacionados com resposta a estresse, virulência e crescimento. Todos esses genes apoiam a concepção de que a fase de levedura pode potencialmente responder ao ataque das condições do hospedeiro. Genes chave nesse processo incluem proteínas de superfície, proteínas relacionadas a estresse, bem como proteínas envolvidas na morfogênese e controle transcricional (Borges *et al.*, 2011a).

Tavares e colaboradores estudaram a resposta transcricional de *P. brasiliensis* à internalização por macrófagos murinos e identificaram genes expressos, principalmente aqueles relacionados à biossíntese de aminoácidos e proteínas de choque térmico, sugerindo que estes genes são relevantes durante o processo de fagocitose por macrófago (Tavares *et al.*, 2007).

Genes expressos durante a transição de conídios para leveduras do fungo *P. brasiliensis* foram analisados por Garcia e colaboradores, que identificaram genes

não observados nas bibliotecas realizadas previamente durante a transição micélio-levedura (Garcia *et al.*, 2009).

1.6 - Utilizações do transcriptoma na elucidação de mecanismos de ação de antifúngicos e na identificação de novos alvos para interferência

Os agentes antifúngicos exercem sua atividade através de uma variedade de mecanismos, alguns dos quais pouco entendidos. Novas abordagens para caracterizar o mecanismo de ação de antifúngicos são úteis no processo de desenvolvimento de novas drogas antifúngicas. Um dos caminhos pelos quais as células se ajustam às mudanças ambientais é através da alteração do padrão de expressão de genes e proteínas. Assim, a medida de mudanças na expressão de genes e proteínas sob exposição às drogas pode ajudar a determinar como as drogas e candidatos às drogas trabalham em células e organismos. Nesse sentido, alterações no perfil de expressão de genes de fungos têm sido estudadas (Liu *et al.*, 2005; Agarwal *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007; Florio *et al.*, 2011).

Utilizando esse enfoque, estudos do perfil genômico foram realizados para avaliar o efeito da anfotericina B, 5-FC, e vários azoles em *Sacharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (Bammert & Fostel, 2000; De Backer *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002a; Zhang *et al.*, 2002b; Zhao *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011a). Esses estudos forneceram uma visão geral dos genes com alteração no perfil de expressão em resposta ao tratamento com essas drogas. Entretanto, foram utilizadas concentrações inadequadas para uma comparação apropriada entre as drogas.

Visando fazer uma análise comparativa entre as drogas utilizadas num mesmo estudo, os genes de *S. cerevisiae* foram investigados em resposta aos representantes das classes dos polienos, pirimidinas, azoles e equinocandinas.

Nesse estudo foi demonstrado que diferenças nas condições ambientais, tais como meio de crescimento, concentração da droga, e período de exposição à droga pode contribuir para alterações na expressão dos genes. Foram identificadas alterações classe-específica e mecanismo-independente. Genes responsivos a cetoconazol, caspofungina, e 5-FC indicaram efeitos droga-específico. A exposição ao cetoconazol afetou genes primariamente envolvidos na biossíntese e captação do ergosterol; exposição à caspofungina afetou genes envolvidos na integridade da parede celular; e 5-FC afetou genes envolvidos na síntese de proteína e DNA, reparo a dano no DNA, e controle do ciclo celular. Ao contrário, alterações induzidas por anfotericina B na expressão de genes foram relacionadas ao estresse celular, reconstrução de membrana celular, transporte, captação de fosfato, e integridade da parede celular. Embora tenham sido identificados genes com maior especificidade para uma droga em particular (genes droga-específicos), também foram encontrados genes sem especificidade para as classes de drogas. Os resultados obtidos forneceram novas informações sobre o mecanismo de ação dessas classes de agentes antifúngicos e demonstraram o potencial de utilização do perfil de expressão de genes no desenvolvimento de drogas antifúngicas (Agarwal *et al.*, 2003).

Estudos similares foram desenvolvidos para *C. albicans* utilizando as mesmas classes de antifúngicos e condições similares de crescimento. Foram encontradas similaridades, mas também diferenças, entre *S. cerevisiae* e *C. albicans*, na resposta a esses agentes antifúngicos. Os experimentos do perfil de expressão gênica revelaram respostas droga-específica consistentes com seu mecanismo de ação, respostas indicativas de outras vias que devem ser afetadas por esses agentes, e

respostas que refletem mecanismos conhecidos e potenciais de resistência a esses agentes antifúngicos (Liu *et al.*, 2005).

Análise do transcriptoma de *Aspergillus fumigatus*, um fungo filamentosos, exposto a voriconazol revelou que a expressão do mRNA de vários genes é dependente da via de sinalização por proteína quinase-AMP cíclico, conservada evolutivamente, auxiliando no entendimento de como o fungo se torna resistente ao voriconazol (Ferreira *et al.*, 2006). Esse estudo identificou uma diminuição da expressão dos genes envolvidos na biossíntese do ergosterol, ao contrário dos estudos previamente realizados para *S. cerevisiae* e *C. albicans* (Agarwal *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005), sugerindo que *A. fumigatus*, sendo um fungo filamentosos, deve responder diferentemente ao antifúngico.

Estudos utilizando microarranjos, com o objetivo de avaliar o perfil transcricional de *Trichophyton rubrum* em resposta a cetoconazol e anfotericina B, revelaram resultados consistentes com os mecanismos de ação conhecidos. Entretanto, houveram também achados específicos em *T. rubrum* que diferiram dos resultados obtidos em trabalhos anteriores para outros fungos (Zhao *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2007). Em um estudo posterior, Diao e colaboradores (2009) expuseram *T. rubrum* ao itraconazol e identificaram mudanças específicas na expressão dos genes consistente com o mecanismo de ação desse composto. Foi observado também mudanças na expressão gênica, os quais codificam produtos com funções relacionadas à adaptação à droga, incluindo resposta a estresse celular, efluxo de drogas e transporte de pequenas moléculas, caracterizando assim, um possível mecanismo de resistência (Diao *et al.*, 2009).

S. cerevisiae é um excelente organismo modelo para estudar ação de antifúngicos devido ao seu genoma já ter sido totalmente sequenciado e bem

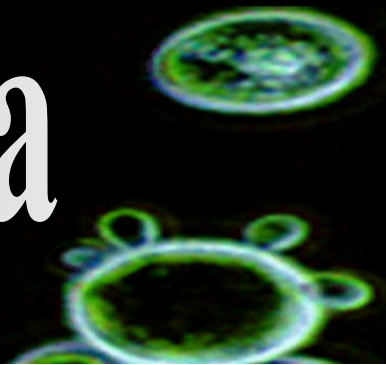
caracterizado, e ao desenvolvimento de microarranjos, possibilitando monitorar globalmente alterações na expressão de genes em resposta a uma variedade de condições experimentais. Em adição, existe a disponibilidade de estoque de mutantes com genes deletados, facilitando a validação de novas hipóteses geradas pelos experimentos de microarranjos (Viscoli *et al.*, 1999). Entretanto, os trabalhos acima demonstraram a importância da realização desses estudos em outros fungos de relevância.

Estudos proteômicos também têm sido realizados visando a elucidação do mecanismo de ação de antifúngicos, incluindo a identificação de novos alvos (Hoehamer *et al.*, 2010; Bruneau *et al.*, 2003; Delom *et al.*, 2006; Hooshdaran *et al.*, 2005; Strom *et al.*, 2005; Angiolella *et al.*, 2009; Rogers *et al.*, 2006; Kley, 2004; Komatsu *et al.*, 2011) e os efeitos sinérgicos entre compostos (Xu *et al.*, 2009). Análise comparativa entre o transcriptoma e o proteoma de *A. fumigatus* exposto à anfotericina B revelou a identificação de um maior número de transcritos em relação ao número de proteínas. Em adição, não foram identificados transcritos referentes a todas as proteínas encontradas no proteoma. Essa abordagem levou à identificação de genes e proteínas específicos de *A. fumigatus* em resposta à anfotericina B (Gautam *et al.*, 2008). Esse estudo demonstra a importância da utilização de abordagens genômica e proteômica integradas no estudo de mecanismo de ação de antifúngicos, bem como na identificação de novos alvos para interferência.

A análise do transcriptoma (Yu *et al.*, 2007; Lopez *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2005; Sigle *et al.*, 2005; Woyke *et al.*, 2004; Gamberi *et al.*, 2007) e do proteoma (Courchesne *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010), incluindo as análises comparativas entre transcriptoma e proteoma (Duy *et al.*, 2007)

de microrganismos, também têm sido utilizadas no estudo do mecanismo de ação de novos compostos antimicrobianos.

Justificativa

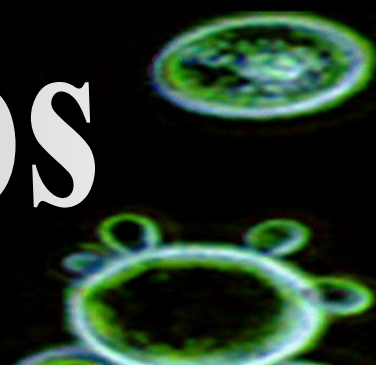


2 - JUSTIFICATIVA

Os agentes antifúngicos exercem sua atividade através de uma variedade de mecanismos, alguns dos quais são pouco entendidos. Novas abordagens para caracterizar o mecanismo de ação de agentes antifúngicos são úteis no processo de desenvolvimento de drogas antifúngicas, bem como para antifúngicos já utilizados. Um dos caminhos pelos quais as células se ajustam a mudanças ambientais é através da alteração do padrão de expressão de genes. Assim, a medida de mudanças na expressão de genes sob exposição às drogas pode ajudar a determinar como as drogas e candidatos a drogas atuam em células e organismos. Nesse sentido, alterações no perfil de expressão de genes de fungos têm sido estudadas em diversos organismos.

Apesar dos esforços para elucidar a ação do sulfametoxazol em bactérias, seu efeito em fungos permanece pouco compreendido, embora o fármaco seja amplamente utilizado no tratamento de micoses, como a paracoccidioidomicose. Nesse contexto, são necessários mais estudos que busquem esclarecer o mecanismo de ação desse composto sobre o agente etiológico *P. brasiliensis*.

Objetivos



3 - OBJETIVOS

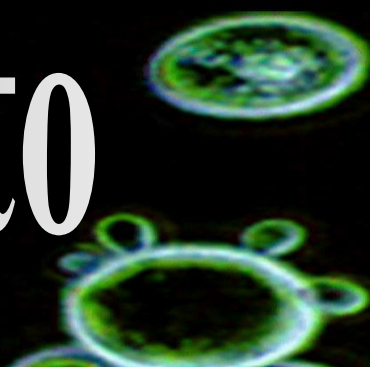
3.2 - Geral

O objetivo do presente estudo é investigar as alterações no perfil de expressão gênica de *P. brasiliensis* após exposição ao sulfametoxazol.

3.2 - Estratégias experimentais

- ✓ Construir bibliotecas subtraídas de cDNA a partir de RNAs obtidos de leveduras crescidas na presença e ausência de sulfametoxazol;
- ✓ Sequenciar as ESTs geradas a partir da técnica de RDA;
- ✓ Validar os transcritos obtidos a partir de leveduras crescidas na presença e ausência de sulfametoxazol utilizando PCR em tempo real (qRT-PCR);
- ✓ Propor um mecanismo de ação do medicamento sulfametoxazol em células leveduriformes de *P. brasiliensis*.

Manuscrito



Transcriptional profile of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in response to sulfamethoxazole

Amanda Gregorim Fernandes¹, Patrícia Fernanda Zambuzzi Carvalho¹, Marize Campos Valadares Bozines², Célia Maria de Almeida Soares¹, Maristela Pereira^{1*}

¹Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

²Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

*Corresponding author: Maristela Pereira, Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, ICBII, Campus II, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brazil. Phone/fax: 55-62-35211110. E-mail: mani@icb.ufg.br

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, sulfamethoxazole, RDA, transcriptome, antifungal.

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic fungal infection caused by the thermo-dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Mycelia and conidia growing *in vitro* at 23°C-26°C and 18°C ± 4°C, respectively, and as saprophytes in soil, water and plants to room temperature are considered the infective forms of the fungus. The yeast phase occurs at 35°-37°C *in vitro* and host tissues. Sulfonamides were the first drugs used for treatment of PCM and continue to be quite active medications nowadays against this fungal infection. It is known that sulfa drugs are competitive antagonist of *p*-aminobenzoic acid (PABA), which condenses with 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7,8 dihydropteridine pyrophosphate (DHPPP) to form dihydropteroate (DHP), a reaction catalyzed by dihydropteroate synthase (DHPS). The aim of this work was investigating the global mechanism of action of sulfamethoxazole on *P. brasiliensis*. Yeast cells were grown on minimum medium in the presence and absence of sulfamethoxazole for 1 and 2 h, at 36°C. After extraction of total RNA, the cDNA was obtained and used to representational difference analysis (RDA) experiments to identify the genes up and down regulated. ESTs sequences were clustered using the CAP3 program and classified in agreement with the functions by using BLAT2GO program. Several transcripts related to mitochondrial function were differentially expressed. Among them could be cited transmembrane GTPase, succinate/fumarate mitochondrial transporter, 3-demethylubiquinone-9-methyltransferase, ATP synthase subunit beta, NADPH dehydrogenase and carnitine/acyl carnitine carrier. Other transcripts related to metabolism, and to unknown functions were up or down regulated. Aiming to validate the RDA and bioinformatics results, we identified genes potentially relevant and then

validated by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Furthermore, to confirm the mitochondrial alteration, the method of reduction of tetrazolium salt 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). The results indicated that sulfamethoxazole acts in *P. brasiliensis* as a competitor for the synthesis of amino acids, nucleic acids and precursors of biosynthesis of folate cofactors, and then destabilizing mitochondrial functions.

Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic fungal mycosis caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (Brummer *et al.*, 1993). PCM typically occurs in rural areas of Latin America. In Brazil, it is the main cause of death among systemic mycoses (Prado *et al.*, 2009). The disease may present a broad spectrum of clinical and pathological manifestations ranging from asymptomatic pulmonary lesions and mild infections spread serious, involving multiple organs, most often the lungs, oropharyngeal mucosa, skin, lymph nodes, adrenal glands, and central nervous system (Bertini *et al.*, 2007). The fungus is thermo-dimorphic, mycelia and conidia are likely to grow in nature and *in vitro* at 23-26°C and 18°C ± 4°C, respectively, and as saprophytes in soil, water, and plants to room temperature. These are considered the infective forms of the fungus (Restrepo *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 2008). The yeast phase occurs at 35°-37°C *in vitro* and at host tissues (Restrepo & Tobon 2005).

The conventional drugs used for treatment of PCM are sulfonamides, amphotericin B and imidazole derivatives such as ketoconazole, itraconazole, and fluconazole (Travassos *et al.*, 2008). Sulfonamides were the first drug used for

treatment of PCM in the 40s decade (Del Negro 1982), and continue to be quite active medications today against this fungal infection, including the severe childhood forms (Ferreira, 2009).

Sulfa drugs are competitive antagonist of p -aminobenzoic acid (PABA) (Hanafy *et al.*, 2007), which is condensed with 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7,8 dihydropteridine pyrophosphate (DHPPP) to form dihydropteroate (DHP), a reaction catalized by dihydropteroate synthase (DHPS). DHPS is a key enzyme involved in folate synthesis (Patel *et al.*, 2004b). Folate cofactors are involved in the biosynthesis of purines and pyrimidines (thymidylate), in the biosynthesis of amino acids such as glycine and methionine, and in the biosynthesis of vitamins such as pantothenic acid (Appling, 1991). However, no study was realized to *P. brasiliensis* yet.

The technique of representational difference analysis (RDA) optimized by Pastorian *et al.* (2000) has been used at our laboratory (Bailão *et al.*, 2006; Bailão *et al.*, 2007; Borges *et al.*, 2011b; Silva *et al.*, 2011b) to identify differentially expressed genes in different conditions. RDA is sensitive and powerful tool that allows the isolation of genes both up and down regulated expressed in two different populations of cDNA (Hubank & Schatz 1994).

The aim of this study was undertaken to monitor the global response of *P. brasiliensis* to the effects of sulfamethoxazole. Using an RDA approach, we identified genes that were differentially expressed in *P. brasiliensis* in response to exposure to a sub-inhibitory concentration of sulfamethoxazole. The data were validated by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and by the method of reduction of tetrazolium salt 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). These

changes in the gene expression profile provide insight into the mechanism of action of sulfamethoxazole on *P. brasiliensis*.

Materials and Methods

Culture and cell viability

P. brasiliensis 01 (ATCC MYA-826) has been studied at our laboratory (Cruz *et al.*, 2011; Tomazett *et al.*, 2010; Tomazett *et al.*, 2011; Zambuzzi-Carvalho *et al.*, 2009; Neto *et al.*, 2009). *P. brasiliensis* yeast cells were sub-cultured every seven days on semi solid Fava-Netto's medium [1% (w/v) peptone; 0.5% (w/v) yeast extract; 0.3% (w/v) proteose peptone; 0.5% (w/v) beef extract; 0.5% (w/v) NaCl; 4% (w/v) glucose; 1% (w/v) agar, pH 7.2] (Fava-Netto, 1955) at 36°C and used throughout this study.

The determination of IC₅₀ was performed according to (Santos *et al.*, 2007) and in accordance with the macro dilution method described in the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A2 (2005) with modifications. To determine the IC₅₀, yeast cells in exponential growth phase were maintained in chemically defined solid medium McVeigh Morton (MMcM) (Restrepo & Jimenez 1980) for seven days at 36°C and inoculated in liquid MMcM. Stock solution (1 mg/mL) containing sterile sulfamethoxazole (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was prepared in dimethylsulfoxide (DMSO). From this solution were performed serial dilutions in sterile MMcM (pH 7.0) as diluent, producing a final concentration of 1.25 – 320 µg/mL (5 – 1260 mM). The drug concentration ranges were selected based on previous studies (Hahn *et al.*, 2003; Afeltra *et al.*, 2002). The controls without antifungal and DMSO are included. The concentrations of inocula were determined

by spectrophotometer using a yeast cell suspension in sterile 0.85% NaCl which gave 10% transmittance at 520 nm. The mixture was stirred to disperse aggregated cells. Yeast cells were collected from the liquid MMcM and counted in a Neubauer chamber for use. An initial inoculum density of 5×10^6 cells/mL was obtained and 0.1 mL aliquots were added to 2.4 mL of MMcM containing drug dilutions. The fungus was grown at 36°C, under agitation at 150 rpm for 5 days. The IC₅₀ was determined from the measured turbidity of the medium. The yeast cell suspensions were vigorously shaken to disperse aggregated cells (Hahn & Hamdan 2000). The experiments were processed in triplicate.

For viability experiments, yeast cells were grown in the presence or in the absence of 0.01 mg/mL (IC₅₀) of sulfamethoxazole, and were kept in liquid MMcM (Restrepo & Jimenez 1980) for 1h, 2h, 3h, 4h and 5h at 36°C and viability of the cells determined by Trypan Blue method (Freshney, 1987). In brief, cells from all incubation time were incubated with a dye solution (0.1% Trypan Blue Stain) for 5 min at room temperature and viability was assessed by counting viable and unviable cells in a Neubauer chamber.

cDNAs obtained from the transcripts of *P. brasiliensis* grown in the presence and absence of sulfamethoxazole

RNA extraction

P. brasiliensis yeast cells were grown in liquid Fava-Netto's medium for 72 h and transfers to the liquid MMcM for 16 h. Following, *P. brasiliensis* yeast cells were grown in liquid MMcM for 1 h and 2 h in the presence and absence of 0.01 mg/mL sulfamethoxazole, and total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad,

CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The RNA was treated with DNase I RNase-free (Invitrogen) to remove chromosomal DNA. The concentration and purity of RNA were determined by spectrophotometer, and RNA integrity was visualized after electrophoresis on 1.2% agarose gel.

Synthesis of cDNAs

The first-strand cDNA synthesis was performed with reverse transcriptase (RT Superscript II, Invitrogen) using 1 ug of RNA, and this was used as template to synthesize the second strand of the cDNA. The cDNA was synthesized using the SMART PCR cDNA kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA). All nucleotides were synthesized by Invitrogen, as described in supplementary table 1.

Generation of cDNA libraries

The cDNA fragments for processing the RDA were generated according to the protocol previously described by Hubank and Schatz (1994) and modified by Pastorian *et al.* (2000). The double-stranded cDNA was digested with restriction enzyme *Sau3AI*. The resulting products were purified using the GFX kit (GE Healthcare, Uppsala, Uppsala län, Sweden). The tester digested cDNA was bound to adapters (a 24-mer annealed to a 12-mer).

A selective amplification subtractive hybridization was performed to the construction of libraries. Briefly, to generate the first differential product (DP1) cDNAs "driver" and "tester" were mixed in a ratio of 10:1, hybridized, and amplified by PCR with the oligonucleotide JBam24 (7 cycles of 45 s at 95°C and 3 min at 72°C, each). PCR products were subjected to a new round of amplification (20 cycles) to remove unwanted single-stranded cDNAs. The final stage of amplification produced the DP1.

To generate the differential secondary products (DP2), the adapters RBam replaced the adapters JBam and the "driver" replaced by "tester" at a rate of 100:1. To isolate the genes induced by sulfamethoxazole, cDNAs from cells grown in the presence of the compound were subtracted from those obtained from cells grown in the absence of the compound. To isolate genes suppressed, a second subtraction was performed in the reverse direction.

After the second subtractive reaction, the cDNA was purified and cloned directly into the pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA). *Escherichia coli* XL1 Blue competent cells were transformed with ligation products.

The plasmid DNAs were prepared from selected clones of subtracted libraries and sequenced with the ET Dye Terminator kit Dyynamic (GE Healthcare) in MegaBACE 1000 DNA sequencer (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) using primers corresponding to the vector pGEM-T Easy.

Processing and annotation of ESTs

The sequences of at least 75 nucleotides, with PHRED ≥ 20 were considered for the assembly and formation of clusters. The assembly of these ESTs was performed using CAP3 (Huang & Madan 1999) and clustered to generate contigs and singlets, which were analyzed. All these tools were integrated into a specific pipeline (<http://www.lbm.icb.ufg.br/pipelineUFG/>). A search for functional categories was performed using the program Blast2GO (<http://www.blast2go.org/>) which provides a comparison between clusters of sequences obtained from public databases. The BLAST program of National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) processed with non-redundant sequences (nr) GenBank and the nucleotide database generated from *P. brasiliensis*

structural

genome

(http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html) were used for the annotation of ESTs. The database sequence matches were considered significant at e-values $\leq 10^{-5}$. The program INTERPROSCAN (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (Apweiler *et al.* 2001) was used to obtain information about the domain present in clusters and the classification of families. The metabolic pathways were analyzed using maps obtained from the KEGG database (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (<http://www.genome.ad.jp/kegg>) (Kanehisa and Goto 2000) with annotated EC numbers, and this information was used to help elucidate the function of ESTs. The Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS) (<http://mips.gsf.de/>) was used to designate the functional categories.

Validation of data obtained by RDA and bioinformatic

Confirmation of the expression of selected genes of *P. brasiliensis* by qRT-PCR

Total RNAs from *P. brasiliensis* yeast cells cultured in the presence and in the absence of sulfamethoxazole were obtained as previously described, in independent experiments from that used in RDA assays. After treatment with DNase, the first strands of cDNAs were synthesized from total RNA using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) and oligo (dT)₁₅ primer according to the supplier's instructions. Gene-specific primers were designed for the gene of interest and for the gene α -tubulin using Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Supplementary table 1). The qRT-PCRs were performed in triplicate the StepOnePlus™ real time PCR system (Applied Biosystems). The PCR thermal

cycling program consisted of 40 cycles of 95°C for 15s; 60°C for 1min. The SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) was used for each reaction that was supplemented with 1pmol of each oligonucleotides gene-specific and 40 ng of template cDNA. A melting curve analysis was performed to confirm the amplification of single PCR product. The data were normalized with gene α -tubulin of *P. brasiliensis*. A non-template control was included. A cDNA for a relative standard curve was generated by polling an aliquot of cDNA from each sample. The standard cDNA was serially diluted 1:5, and a standard curve was generated by using four samples from the pooled cDNA. Relative expression levels of genes of interest were calculated using the standard curve method for relative quantification (Bookout *et al.*, 2006).

Assessment of mitochondrial activity of *P. brasiliensis* by MTT assay

P. brasiliensis yeast cells (1×10^6 cells/well) were seeded in 96-well plate (TPP, Trasadingen, Zürich, Schweiz), and incubated with different concentrations of sulfamethoxazole (1.28, 0.64, 0.32, 0.16, 0.08, 0.04, 0.02 and 0.01 mg/mL), in sextuplicate. After incubation at 36°C for 120 h, in a shaker at 180 rpm, each well received 20 μ L of MTT (Sigma-Aldrich) at 5 mg/mL, and the plate was again incubated for 4 h. After that, the plate was centrifuged at 800 rpm for 10 min, and the supernatant was discarded carefully. It was added 100 μ L of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) in each well for solubilization of formazan crystals; the plate was gently homogenized, and the concentration of formazan solubilized was quantified spectroscopically using an ELISA reader (Stat Fax 2100, Awareness Technology, Dusseldorf, Germany) at a wavelength of 540 nm. The

absorbance of control cells (untreated) was considered 100% cell viability; the control contained only DMSO. The cytotoxicity of the compound was calculated as follows:

$$\text{Viability} = \frac{\text{Mean absorbance for each concentration of the extract} - \text{control} \times 100}{\text{Mean absorbance of control} - \text{control}}$$

The MTT test was performed three times, and each concentration of compound sulfamethoxazole was performed in sextuplicate. The results of viability were plotted (Graphpad Prism 5.0, Software, San Diego, CA, USA).

Results

Construction of cDNA libraries

To the construction of cDNA libraries was used the concentration of 0.01 mg/mL sulfamethoxazole corresponding to IC₅₀ to *P. brasiliensis*. On the other hand, the times were chosen where the fungus had around 75% of viability (data not shown). In this way, to identify *P. brasiliensis* genes differentially regulated in the presence of sulfamethoxazole, it was determined the transcriptional profile of *P. brasiliensis* exposed to 0.01 mg/mL of this compound grown for 1 h and 2 h at 36°C. After total RNA extraction and RDA assay, the differential products were cloned in pGEM-T Easy vector and sequenced.

A total of 827 clones were successfully sequenced. From these, 102 and 204 clones up and down regulated, respectively, were obtained from *P. brasiliensis* yeast cells after incubation with sulfamethoxazole for 1 h; and 260 and 261 clones up and

down regulated, respectively, were obtained from *P. brasiliensis* yeast cells after incubation with sulfamethoxazole for 2 h.

Global gene expression profile

For libraries of induced genes after 1 h of exposure of the fungus to sulfamethoxazole, a total of 16 genes were grouped into 24 clusters representing 17 contigs and 7 singlets. To 2 h, a total of 15 genes were grouped into 52 clusters with 31 contigs and 21 singlets. For libraries repressed genes after 1 h of exposure it was found 42 genes, grouped into 55 clusters, with 25 contigs and 30 singlets. To 2 h, it was found 10 genes grouped into 35 clusters corresponding to 24 contigs and 11 singlets.

The differentially expressed genes were classified by functional category, and the general distribution of genes among various functional groups was obtained (Table 1). In total, 66 genes were differentially expressed upon exposure to sulfamethoxazole; 16 and 42 of which showed a significant increase and decrease of expression after 1 h; 15 and 10 genes had expression increased and decreased after 2 h of exposure to sulfamethoxazole, respectively. A total of 17 genes differentially expressed were common to both times. A total of 17% of the genes responding to sulfamethoxazole were classified as 'unknown function', indicating that the ESTs have not been identified previously and there is no amino acid sequence homology with other proteins of known function.

The distribution of differentially expressed genes in biological functional groups was evaluated (Table 1; Figure 1A and 1B). From this analysis it can be observed that most of the genes down regulated after 1 h incubation participate in cellular processes related to cell metabolism and cell rescue, defense and virulence.

On the other hand, the up regulated genes were mostly found to function in transcription, cellular transport, transport facilities and transport routes. After 2 h, most of the down regulated genes are also involved in metabolism; the up regulated genes participate in cell rescue, defense and virulence.

Specifically, genes from respiratory complex groups, such as, ADP/ATP carrier protein, ATP synthase subunit beta and 3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase, and from β -oxidation, such as, acyl-CoA dehydrogenase, short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase and carnitine/acyl carnitine carrier, were most of them down regulated. Many genes involved in cell rescue, defense and virulence or cellular transport were up regulated, for instance various heat shock proteins, major facilitator superfamily transporter and ABC transporter.

Among potentially relevant genes and those which had more representation in the number of ESTs in response to sulfamethoxazole can be cited betain aldehyde dehydrogenase, cysteine desulfurase, glutamine synthetase, C6 transcription factor, Sexual development transcription factor NsdD, ATP-dependent RNA helicase, guanine nucleotide-binding protein alpha-1 subunit, senescence-associated protein, and the heat shock protein HSP30, HSP60 and HSP70.

Data for a few selected genes are shown in figure 2 to highlight the overall biological response to sulfamethoxazole. Thus, we can see a general way that most of the genes repressed in presence of sulfamethoxazole were related to generation of precursors metabolites and energy production and, the metabolism of lipids. Furthermore, the genes induced in the presence of compound are more related to the response to stimuli and cellular defense.

Validation of RDA and bioinformatic data by qRT-PCR

To validate the data obtained through RDA and bioinformatic, it was selected genes potentially relevant to mitochondrial functions and cellular metabolism, including β -oxidation, for analysis of transcripts expression levels by qRT-PCR. Fourteen target genes were chosen and the total RNA from *P. brasiliensis* yeast cells cultured in the presence and in the absence of sulfamethoxazole was obtained as previously described, in independent experiments. The genes include glutamine synthetase (GLN1), ribulose 5-phosphate 3-epimerase (RPE1), ATP synthase beta subunit (ATP2), ADP/ATP carrier protein (AAC), succinate/fumarate mitochondrial transporter (ACR1), short chain acyl-CoA dehydrogenase (SCDA), Acyl-CoA dehydrogenases (ACAD), 3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase (COQ3), ubiquitin (UBI), carnitine/acyl-carnitine carrier (ACUH), NADPH dehydrogenase (OYE) and transmembrane GTPase (FZO1). Values with $p \leq 0.05$ were considered statistically significant. In general, the transcripts expression levels changed similarly to those found to RDA method and bioinformatic (Figure 3A).

The enzymes dihydropteroate synthase (DHPS), previously described as a target to sulfamethoxazole in fungus, and dihydrofolate reductase (DHFR), the last enzyme in the biosynthesis of folate cofactors, were analyzed by qRT-PCR, although they have not been found in RDA approach. In figure 3B, it was possible to visualize that the transcriptional levels of DHPS and DHFR are high after 6 h of exposure of *P. brasiliensis* yeast cells to sulfamethoxazole.

Validation of RDA and bioinformatic data by MTT assay

The MTT assay is an alternative method based on the transformation and colorimetric quantification of MTT. The respiratory chain (Slater *et al.*, 1963) and other electron transport systems (Liu *et al.*, 1997) reduce MTT and other tetrazolium

salts and thereby form non-water-soluble violet formazan crystals within the cell (Altman, 1976). The amount of these crystals can be determined spectrophotometrically and serves as an estimate for the number of mitochondria and hence the number of living cells in the sample (Denizot & Lang 1986). This assay has been used successfully to verify mitochondrial reduction capacity and viability (Kim *et al.*, 2009).

In this way, MTT method was performed to verify the compromising of *P. brasiliensis* mitochondrial activity regarding the compound. The results demonstrated that *P. brasiliensis* yeast cells exposure to sulfamethoxazole (0.01–1.28 mg/mL) produced a marked dose-dependent effect with IC₅₀ values, 0.01 mg/mL (Figure 4).

Discussion

PCM is a granulomatous, chronic, infectious, subacute or seldom acute disease (Marques, 1998). Spontaneous cure is not frequently seen in PCM, except in some cases of primary lung infections (Miyaji & Kamei 2003). PCM treatment includes the use of antifungal drugs, nutritional support, treatment of the eventual sequelae and comorbidities, and the prevention of opportunist diseases (Mendes-Giannini *et al.* 2004; Ramos & Saraiva 2008). The present study describes the adaptive cellular responses of *P. brasiliensis* to sulfamethoxazole at the transcriptome level.

Here we investigated the mode of action of sulfamethoxazole in *P. brasiliensis*. RDA study was performed in *P. brasiliensis* yeast cells treated and untreated with sulfamethoxazole and the results were confirmed by qRT-PCR and MTT assay. It was found that differentially expressed genes were involved in multiple biochemical

functions. Our particular interest was the striking changes of energy-metabolism-related genes after sulfamethoxazole treatment: the downregulated mitochondrial genes and the up regulated genes that may be related to the biosynthesis of amino acids, purine and pyrimidine and them, precursors to the route of the biosynthesis of folate cofactors.

According to Castelli and employees sulfa drugs inhibit *S. cerevisiae* growth through competition with PABA, which is the precursor for the biosynthesis of folate cofactors that are active in the metabolism of one-carbon (Castelli *et al.*, 2001). Thus, one-carbon units that are carried and donated by tetrahydrofolate derivatives, are essential for providing active one-carbon groups to the biosynthesis of methionine, but also to those of purines and thymidylate (Cherest *et al.*, 2000). In *S. cerevisiae*, as well as in other eukaryotes, both the cytoplasmic and mitochondrial compartments possess a set of enzymes that catalyzes the interconversion of folate coenzymes. In the cytoplasm, folate coenzymes participate in the synthesis of methionine, purines, and thymidylate. In mitochondria, folate are required for the formylation of the initiator tRNA for mitochondrial protein synthesis (Appling, 1991). In *S. cerevisiae*, those one-carbon donors such as serine, glycine, and formate are able to cross the mitochondrial membrane (Kastanos *et al.*, 1997). Some studies show that mitochondrial protein synthesis is required for maintenance of an intact mitochondrial genome in *S. cerevisiae* (Tzagoloff & Shtanko 1995). Moreover, inhibition of mitochondrial protein synthesis by the use of antifolates has been shown to induce cytoplasmic respiration-deficient strains (Wintersberger & Hirsch 1973).

Our data allowed the identification of genes in the *P. brasiliensis* transcriptome which are impacted upon sulfamethoxazole treatment. Interestingly, sulfamethoxazole treated cells resulted in significant downregulation of protein

expression levels involved in mitochondrial functions. For instance, ACR1 was significantly down regulated after 1 h of exposure. In *S. cerevisiae* it was shown that Acr1p is able specifically to counter transport succinate and fumarate, which are already known to be transporters for several substrates at the inner mitochondrial membrane (Palmieri *et al.*, 1997). ACR1 is thus strictly coregulated with the genes for key enzymes of the glyoxylate cycle and gluconeogenesis. Supporting the idea that Acr1p is the factor which transports succinate from the cytosol into the mitochondrial matrix, in exchange for fumarate, ACR1 form an essential link between the glyoxylate and TCA cycles during growth on ethanol or acetate (Bojunga *et al.*, 1998). In addition, the expression of ACR1 is repressed by glucose (Fernandez *et al.*, 1994). The ACR1 does make a small contribution to the basal proton conductance of yeast mitochondria (Roussel *et al.*, 2002). So, the down regulation of ACR1, in 1h, could help to cause dysfunction of the potential of membranes for its influence in the electron transport chain and ATP production, in *P. brasiliensis*.

Furthermore, we find also COQ3, the gene for a protein that participates in the biosynthesis of Coenzyme Q, which is related to a decrease of oxidation coupled with ATP synthesis. Down regulation in the gene expression levels of COQ3 by exposure to sulfamethoxazole could thus affect ATP synthesis as well.

The other classes of down regulated genes were those involved in ATP energy metabolism. Our data showed that in *P. brasiliensis* sulfamethoxazole significantly down regulated the ATP2. The F1F0-ATPase or ATP synthase rotates inside the cylinder formed by the six alpha and beta subunits and it compels the beta subunits to undergo structural changes (Komatsu *et al.*, 2011). Since the expression of ATP synthase subunit beta was decreased in the fungus treated with sulfamethoxazole, this could disrupt the production of ATP. In contrast to the

suppression of ATP2, the expression level of the potential mitochondrial inner membrane ATP/ADP translocator, AAC, showed an increase after 1 h of sulfamethoxazole exposure. From these results, we could postulate that mitochondrial ATP synthesis is reduced because of through inhibition of the F1F0-ATPase, and that the reduction in mitochondrial ATP is further accelerated by transportation of ATP from the mitochondrial matrix to the cytoplasm by increased expression of the mitochondrial inner membrane ATP/ADP translocator.

The results from our work suggest that the efficiency of mitochondrial aerobic respiration might decrease after sulfamethoxazole treatment. To test this hypothesis, functional analysis was carried out to measure mitochondrial activity in *P. brasiliensis* treated or untreated with sulfamethoxazole by using MTT assay. The results demonstrated a reduction in mitochondrial activity dose-dependent against *P. brasiliensis*, confirming the transcriptional data.

Aspergillus nidulans contains both peroxisomal and mitochondrial β -oxidation pathways and all genes encoding the proteins required for mitochondrial β -oxidation of even numbered short chain fatty acids, but not long chain fatty acids have been identified (Maggio-Hall & Keller 2004; Maggio-Hall *et al.*, 2008). In this microorganism the catabolism of fatty acids begins to be oxidized in the peroxisome to acetyl-CoA, which is transported into the mitochondria for its complete oxidation by the TCA. Acetyl moieties are imported into the mitochondria as esters with carnitine using the mitochondrial inner membrane carnitine/acylcarnitine carrier encoded by the ACUH gene (De Lucas *et al.*, 1999). Localization studies have clearly demonstrated the exclusive targeting of the ACUH gene product to the mitochondrial inner membrane (Ramon De Lucas *et al.*, 2001; van Roermund *et al.*, 1999). In *P. brasiliensis* the

gene ACUH, and ACAD and SCDA were found repressed after 1 h of exposure to sulfamethoxazole, which could compromise the mitochondrial β -oxidation.

We propose a model for the mode of action of the sulfamethoxazole transcripts considering available literature as well as the observations reported here. We could infer that seems to be (i) dissipation and permeabilization of mitochondrial membrane potential since COQ3 and ATP2 are down regulated, and AAC are upregulated in 2h; (ii) inhibition of the activity of the gluconeogenesis precipitated by down regulation of transporter ACR1; (iii) inhibition of β -oxidation by repression of genes ACAD, SCDA and ACUH involved in this pathway into the mitochondrial matrix. The decrease in ATP production by F1F0-ATPase would result from down regulation of ATP2 subunit. Taking all together, the key steps in the sulfamethoxazole antifungal mechanism would involve a bioenergetic collapse of *P. brasiliensis* caused essentially by a decrease in mitochondrial ATP synthesis (Figure 5).

Beyond the bioenergetic collapse caused by the repression of energy-metabolism-related genes, *P. brasiliensis* also could have impairment of mitochondrial biogenesis by the down regulated gene FZO1. Maintaining the capacity of the mitochondria to fuse normally is essential to inheritance of mtDNA and in turn for respiration. Fragmentation of the mitochondria leads to a loss of mtDNA and respiratory incompetence in *S. cerevisiae* (Hermann *et al.*, 1998). Regulating levels of expression of Fzo1p is of critical importance; as either deletion or over expression of Fzo1p alters the mitochondrial fusion process resulting in fissioned or abnormal aggregated mitochondria, respectively (Hermann *et al.*, 1998; Fritz *et al.*, 2003).

Apart from the energy-metabolism-related genes, some other differentially expressed proteins were also identified in this study. GLN1 and RPE1 have been reported to be involved in pentose phosphate pathway.

GLN1 is an enzyme that catalyzes the condensation of glutamate and ammonium to form glutamine, with concomitant hydrolysis of ATP (Eisenberg *et al.*, 2000). Glutamate and glutamine are used as amino donors in all other biosynthetic reactions (Magasanik, 1992). Glutamine can also be used as sole nitrogen source (Cogoni *et al.*, 1995).

GLN1 is involved in nitrogen metabolism being regulated to Gln3p or Gcn4p, the latter it is a transcription factor whose activity increases under amino acid starvation conditions, for the *S. cerevisiae* (Daugherty *et al.*, 1993; Dever *et al.*, 1992). Moreover, the enzyme *p*-aminobenzoate synthase catalyzes the conversion of chorismate and glutamine, product of GLN1, to an unidentified intermediate which is converted to PABA by a second enzyme (Nichols *et al.*, 1989). PABA is essential for the biosynthesis of dihydrofolate, which in various forms participates in the synthesis of purines, pyrimidines, formylmethionyl-tRNA, and some amino acids and vitamins, as mentioned earlier (Bognar *et al.*, 1985).

Finally, we propose that, in *P. brasiliensis* the GLN1 of the product could be donating nitrogen for the synthesis of nucleic acids and amino acids, or even for the metabolism of purines or condensing with chorismate to produce the substrates for the biosynthesis pathway of folate cofactors.

Chorismate is a common intermediate in the biosynthesis of aromatic metabolites such as aromatic amino acids and folate cofactors (Floss *et al.*, 1972). The shikimate pathway starts with the condensation of erythrose-4-phosphate and phosphoenolpyruvate to 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate, which is

converted to the branch point compound chorismate (Knaggs, 2001), which is also a precursor for the aromatic amino acids tyrosine, phenylalanine, and tryptophan. Erythrose-4-phosphate is the product of pentose phosphate pathway, which is involved in the action of the enzyme RPE1 over expressed in *P. brasiliensis* in treatment of sulfamethoxazole in 2h. So, we propose GLN1 and RPE1 be participating in the production of substrates for the biosynthesis of folate cofactors. We can be considered as a compensatory mechanism, because as already described for other fungi, sulfamethoxazole inhibits this pathway (Moukhliis *et al.*, 2010; Hanafy *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2004a). The pentose phosphate pathway is required for NADPH generation and nucleotide biosynthesis (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2007).

Several studies prove the performance of sulfamethoxazole in the DHPS enzyme in other fungi (Moukhliis *et al.*, 2010; Hanafy *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2004a). DHPS transcript was not found in our RDA analysis; however, qRT-PCR analysis showed the transcript level was highly reduced after 6 h of exposure to the compound. The effect in the transcript level to inhibitor of protein has been described in *Candida albicans*. The antifungal echinocandin, which inhibits the enzyme (1,3)- β -D-glucan synthase, inhibits also the RNA synthesis when at high concentrations, indicating that it had secondary effect. On the contrary DHFR showed a significant increase in expression after 6 h of exposure to the compound. We could suggest that DHFR was set up to compensate for the small quantity of products formed by DHPS enzyme inhibitory competition with PABA and sulfamethoxazole.

Drug resistance is often associated with the over expression of genes encoding efflux pumps (Lupetti *et al.*, 2002). Two classes of efflux pumps, membrane transport proteins belonging either to the major facilitator superfamily (MFS) or to the

ATP-binding cassette (ABC) superfamily, have been implicated in azole resistance (Ghannoum & Rice, 1999). Over expression of genes encoding efflux pumps is presumed to prevent accumulation of itraconazole in the fungal cell (Diao *et al.*, 2009). In *P. brasiliensis* this could also occur because MFS and ABC transporters are up regulated after 1h of treatment with sulfamethoxazole.

The response of *P. brasiliensis* to sulfamethoxazole includes changing the profile of HSPs. HSPs may be related with the cellular response to various stressors such as changes in pH, the action of cytotoxic drugs and oxidative stress (Matuszewska *et al.*, 2008; Kalmar & Greensmith, 2009; Dempsey *et al.*, 2010; Squina *et al.*, 2010). They are molecules responsible for preventing damage to proteins (Gupta & Golding, 1993) and in *P. brasiliensis* were more expressed in the pathogenic form (da Silva *et al.*, 1999). Thus, we can justify the recovery of the transcriptional levels after 2 h of incubation with sulfamethoxazole compared to untreated control in the qRT-PCR.

In conclusion, the results of the present study demonstrate that sulfamethoxazole treatment could impair mitochondrial fitness and overexpression of genes related to biosynthesis of amino acids and nucleic acids in *P. brasiliensis*, and them, genes related to biosynthesis of precursors of pathway biosynthesis of folate cofactors. We can thus suggest that there is increased ROS production by affecting aerobic respiration in mitochondria, contributes to the antifungal effect by means of strong oxidative damage to the organism. This biochemical process might be involved in the mechanism of the action of sulfamethoxazole against *P. brasiliensis*.

Figure Legends

Figure 1 - Distribution of differentially expressed genes in biological functional groups. *P. brasiliensis* yeast cells were treated with sulfamethoxazole for 1 h (A) or 2 h (B). The numbers of ESTs are indicated with white bar segments for the down regulated genes and with gray bar segments for the up regulated genes. The numbers of ESTs of each category are shown (refers to Table 1). Functional classification was based on the homology of each EST against the GenBank non-redundant database at a significant homology cut-off $\leq 1e^{-05}$ and on the MIPS functional annotation scheme. Each functional class is represented as a segment and expressed as a number of EST in each library.

Figure 2 - Distribution of genes responding to sulfamethoxazole in *P. brasiliensis*. Data are shown for a subset of genes that were significantly induced or repressed. Data were organized into various biological processes using Functional Categories MIPS and GO tools. Signals in parentheses represent change in gene expression. Positive signals indicate induction, and negative values indicate repression. A complete list of all significant genes can be found on table 1.

Figure 3 - Expression profiles of GLN1, RPE1, ATP2, AAC, ACR1, SCDA, ACAD, COQ3, UBI, ACUH, OYE, FZO1 (A), DHPS and DHFR (B) genes of *P. brasiliensis* exposed to sulfamethoxazole. Mean fold changes were calculated by relative standard curve method using the control non-treated samples as the calibrator. Each error bar represents the standard error of the mean (\pm SD) and significant-fold changes are denoted by asterisks in the figure ($*p \leq 0.05$). Data were normalized with

the transcript encoding the α -tubulin protein. Student's t test was used for statistical comparisons.

Figure 4 – Effect of sulfamethoxazole on cell viability of *P. brasiliensis* by using MTT assay. *P. brasiliensis* yeast cells were maintained in culture medium (control) or incubated with various concentrations of sulfamethoxazole (0.01 – 1.28 mg/mL) for 120 h. Results are expressed as percentage of cell viability by MTT reduction obtained through the mitochondrial activity in relation to control cells maintained in culture medium. Each value represents the mean \pm SD from 3 experiments, performed in sextuplicate.

Figure 5 – Hypothetical model for the mode of action of sulfamethoxazole against *P. brasiliensis*. The entry of sulfamethoxazole in the cell of *P. brasiliensis* causes the dissipation of the mitochondrial membrane potential because it interferes in the biosynthesis of the electron transport chain due to the down regulation COQ3. The Krebs cycle and gluconeogenesis is inhibited by low expression of ACR1. Sulfamethoxazole reduces the expression of ATP2 subunit of F1F0-ATPase complex leading to a decrease in production of ATP, and ATP levels are further reduced by the apparent up regulation of the AAC. Down regulation of β -oxidation enzymes, in addition, reduces the fitness of cells in general. Moreover, mitochondrial biogenesis is compromised by being related to low expression of FZO1. The result is the release of intracellular ATP and other nucleotides, as well as of molecules essential to storage energy in the cell.

References

Afeltra, J., Meis, J. F., Vitale, R. G., Mouton, J. W. and Verweij, P. E. (2002). In vitro activities of pentamidine, pyrimethamine, trimethoprim, and sulfonamides against *Aspergillus* species. *Antimicrob Agents Chemother* 46(6): 2029-2031.

Agarwal, A. K., Rogers, P. D., Baerson, S. R., Jacob, M. R., Barker, K. S., Cleary, J. D., Walker, L. A., Nagle, D. G. and Clark, A. M. (2003). Genome-wide expression profiling of the response to polyene, pyrimidine, azole, and echinocandin antifungal agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278(37): 34998-35015.

Altman, F. P. (1976). Tetrazolium salts and formazans. *Prog Histochem Cytochem* 9(3): 1-56.

Angiolella, L., Vitali, A., Stringaro, A., Mignogna, G., Maras, B., Bonito, M., Colone, M., Palamara, A. T. and Cassone, A. (2009). Localisation of Bgl2p upon antifungal drug treatment in *Candida albicans*. *Int J Antimicrob Agents* 33(2): 143-148.

Appling, D. R. (1991). Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes. *FASEB J* 5(12): 2645-2651.

Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Bateman, A., Birney, E., Biswas, M., Bucher, P., Cerutti, L., Corpet, F., Croning, M. D., Durbin, R., Falquet, L., Fleischmann, W., Gouzy, J., Hermjakob, H., Hulo, N., Jonassen, I., Kahn, D., Kanapin, A., Karavidopoulou, Y., Lopez, R., Marx, B., Mulder, N. J., Oinn, T. M., Pagni, M., Servant, F., Sigrist, C. J. and Zdobnov, E. M. (2001). The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Nucleic Acids Res* 29(1): 37-40.

Arikan, S., Sancak, B. and Hascelik, G. (2005). In vitro activity of caspofungin compared to amphotericin B, fluconazole, and itraconazole against *Candida* strains isolated in a Turkish University Hospital. *Med Mycol* 43(2): 171-178.

Bagagli, E., Bosco, S. M., Theodoro, R. C. and Franco, M. (2006). Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Genet Evol* 6(5): 344-351.

Bagagli, E., Theodoro, R. C., Bosco, S. M. and McEwen, J. G. (2008). *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia* 165(4-5): 197-207.

Bailão, A. M., Schrank, A., Borges, C. L., Dutra, V., Molinari-Madlum, E. E. W. I., Felipe, M. S. S., Mendes-Giannini, M. J. S., Martins, W. S., Pereira, M. and Soares, C. M. A. (2006). Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microbes Infect* 8(12-13): 2686-2697.

Bailão, A. M., Shrank, A., Borges, C. L., Parente, J. A., Dutra, V., Felipe, M. S., Fiuza, R. B., Pereira, M. and Soares, C. M. A. (2007). The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51(1): 43-57.

Bammert, G. F. and Fostel, J. M. (2000). Genome-wide expression patterns in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of drug treatments and genetic alterations affecting biosynthesis of ergosterol. *Antimicrob Agents Chemother* 44(5): 1255-1265.

Bastos, K. P., Bailao, A. M., Borges, C. L., Faria, F. P., Felipe, M. S., Silva, M. G., Martins, W. S., Fiuza, R. B., Pereira, M. and Soares, C. M. A. (2007). The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol* 7: 29.

Bertini, S., Colombo, A. L., Takahashi, H. K. and Straus, A. H. (2007). Expression of antibodies directed to *Paracoccidioides brasiliensis* glycosphingolipids during the course of paracoccidioidomycosis treatment. *Clin Vaccine Immunol* 14(2): 150-156.

Bognar, A. L., Osborne, C., Shane, B., Singer, S. C. and Ferone, R. (1985). Folylpoly-gamma-glutamate synthetase-dihydrofolate synthetase. Cloning and high expression of the *Escherichia coli folC* gene and purification and properties of the gene product. *J Biol Chem* 260(9): 5625-5630.

Bojunga, N., Kotter, P. and Entian, K. D. (1998). The succinate/fumarate transporter Acr1p of *Saccharomyces cerevisiae* is part of the gluconeogenic pathway and its expression is regulated by Cat8p. *Mol Gen Genet* 260(5): 453-461.

Bookout, A. L., Cummins, C. L., Mangelsdorf, D. J., Pesola, J. M. and Kramer, M. F. (2006). High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. *Current Protocols in Molecular Biology*. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston et al. Hoboken NJ, John Wiley and Sons: 1581–1628.

Borges, C. L., Bailao, A. M., Bao, S. N., Pereira, M., Parente, J. A. and Soares, C. M. A. (2011). Genes potentially relevant in the parasitic phase of the fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* 171(1): 1-9.

Brummer, E., Castaneda, E. and Restrepo, A. (1993). Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 6(2): 89-117.

Bruneau, J. M., Maillet, I., Tagat, E., Legrand, R., Supatto, F., Fudali, C., Caer, J. P., Labas, V., Lecaque, D. and Hodgson, J. (2003). Drug induced proteome changes in *Candida albicans*: comparison of the effect of beta(1,3) glucan synthase inhibitors and two triazoles, fluconazole and itraconazole. *Proteomics* 3(3): 325-336.

Carrero, L. L., Nino-Vega, G., Teixeira, M. M., Carvalho, M. J., Soares, C. M. A., Pereira, M., Jesuino, R. S., McEwen, J. G., Mendoza, L., Taylor, J. W., Felipe, M. S. and San-Blas, G. (2008). New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol* 45(5): 605-612.

Castelli, L. A., Nguyen, N. P. and Macreadie, I. G. (2001). Sulfa drug screening in yeast: fifteen sulfa drugs compete with *p*-aminobenzoate in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 199(2): 181-184.

Cherest, H., Thomas, D. and Surdin-Kerjan, Y. (2000). Polyglutamylation of folate coenzymes is necessary for methionine biosynthesis and maintenance of intact mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275(19): 14056-14063.

Cogoni, C., Valenzuela, L., Gonzalez-Halphen, D., Olivera, H., Macino, G., Ballario, P. and Gonzalez, A. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide. *J Bacteriol* 177(3): 792-798.

Conti-Diaz, I. A. (2007). On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*: our hypothesis of 1989: present status and perspectives. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 49(2): 131-134.

Corte, A. C., Svoboda, W. K., Navarro, I. T., Freire, R. L., Malanski, L. S., Shiozawa, M. M., Ludwig, G., Aguiar, L. M., Passos, F. C., Maron, A., Camargo, Z. P., Itano, E. N. and Ono, M. A. (2007). Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Parana State, Brazil. *Mycopathologia* 164(5): 225-228.

Costa, M., Borges, C. L., Bailao, A. M., Meirelles, G. V., Mendonca, Y. A., Dantas, S. F., de Faria, F. P., Felipe, M. S., Molinari-Madlum, E. E., Mendes-Giannini, M. J., Fiuza, R. B., Martins, W. S., Pereira, M. and Soares, C. M. A. (2007). 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): 4194-4207.

Courchesne, W. E., Tunc, M. and Liao, S. (2009). Amiodarone induces stress responses and calcium flux mediated by the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Microbiol* 55(3): 288-303.

Coutinho, Z. F., Silva, D., Lazera, M., Petri, V., Oliveira, R. M., Sabroza, P. C. and Wanke, B. (2002). Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica* 18(5): 1441-1454.

Cruz, A. H., Brock, M., Zambuzzi-Carvalho, P. F., Santos-Silva, L. K., Troian, R. F., Goes, A. M., Soares, C. M. A. and Pereira, M. (2011). Phosphorylation is the major mechanism regulating isocitrate lyase activity in *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *FEBS J* 278(13): 2318-2332.

Da Lacaz, C. S., Ulson, C. M. and De Prado Sampaio, S. A. (1959). [In vitro action of amphotericin B on *Paracoccidioides brasiliensis*]. *Rev Paul Med* 54(5): 357-360.

da Silva Castro, N., Barbosa, M. S., Maia, Z. A., Bao, S. N., Felipe, M. S., Santana, J. M., Soares Mendes-Giannini, M. J., Pereira, M. and de Almeida Soares, C. M. A. (2008). Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* PbDfg5p, a cell-wall protein implicated in filamentous growth. *Yeast* 25(2): 141-154.

da Silva, M. B., Marques, A. F., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., Travassos, L. R. and Taborda, C. P. (2006). Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect* 8(1): 197-205.

da Silva, S. P., Borges-Walmsley, M. I., Pereira, I. S., Soares, C. M. A., Walmsley, A. R. and Felipe, M. S. (1999). Differential expression of an hsp70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mol Microbiol* 31(4): 1039-1050.

Daugherty, J. R., Rai, R., el Berry, H. M. and Cooper, T. G. (1993). Regulatory circuit for responses of nitrogen catabolic gene expression to the GLN3 and DAL80 proteins and nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 175(1): 64-73.

De Backer, M. D., Ilyina, T., Ma, X. J., Vandoninck, S., Luyten, W. H. and Vanden Bossche, H. (2001). Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray. *Antimicrob Agents Chemother* 45(6): 1660-1670.

De Lucas, J. R., Dominguez, A. I., Valenciano, S., Turner, G. and Laborda, F. (1999). The *acuH* gene of *Aspergillus nidulans*, required for growth on acetate and long-chain fatty acids, encodes a putative homologue of the mammalian carnitine/acylcarnitine carrier. *Arch Microbiol* 171(6): 386-396.

De Moraes Borba, C. and Schaffer, G. M. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and an attempt to induce the dimorphic process with fetal calf serum. *Mycoses* 45(5-6): 174-179.

Del Negro, G. (1982). Ketoconazole in paracoccidioidomycosis. A long-term therapy study with prolonged follow-up. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 24(1): 27-39.

Delom, F., Szponarski, W., Sommerer, N., Boyer, J. C., Bruneau, J. M., Rossignol, M. and Gibrat, R. (2006). The plasma membrane proteome of *Saccharomyces cerevisiae* and its response to the antifungal calcofluor. *Proteomics* 6(10): 3029-3039.

Dempsey, N. C., Ireland, H. E., Smith, C. M., Hoyle, C. F. and Williams, J. H. (2010). Heat Shock Protein translocation induced by membrane fluidization increases tumor-cell sensitivity to chemotherapeutic drugs. *Cancer Lett* 296(2): 257-267.

Denizot, F. and Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89(2): 271-277.

Dever, T. E., Feng, L., Wek, R. C., Cigan, A. M., Donahue, T. F. and Hinnebusch, A. G. (1992). Phosphorylation of initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell* 68(3): 585-596.

Diao, Y., Zhao, R., Deng, X., Leng, W., Peng, J. and Jin, Q. (2009). Transcriptional profiles of *Trichophyton rubrum* in response to itraconazole. *Med Mycol* 47(3): 237-247.

Dupont, B. (2002). Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *J Antimicrob Chemother* 49 Suppl 1: 31-36.

Duy, N. V., Mader, U., Tran, N. P., Cavin, J. F., Tam le, T., Albrecht, D., Hecker, M. and Antelmann, H. (2007). The proteome and transcriptome analysis of *Bacillus subtilis* in response to salicylic acid. *Proteomics* 7(5): 698-710.

Eisenberg, D., Gill, H. S., Pfluegl, G. M. and Rotstein, S. H. (2000). Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochim Biophys Acta* 1477(1-2): 122-145.

Fava-Netto, C. (1955). Estudos quantitativos sobre a fixação de complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. *Arq. Cir. Clin. Exp.* 18: 197-254.

Felipe, M. S., Andrade, R. V., Arraes, F. B., Nicola, A. M., Maranhao, A. Q., Torres, F. A., Silva-Pereira, I., Pocas-Fonseca, M. J., Campos, E. G., Moraes, L. M., Andrade, P. A., Tavares, A. H., Silva, S. S., Kyaw, C. M., Souza, D. P., Pereira, M., Jesuino, R. S., Andrade, E. V., Parente, J. A., Oliveira, G. S., Barbosa, M. S., Martins, N. F., Fachin, A. L., Cardoso, R. S., Passos, G. A., Almeida, N. F., Walter, M. E., Soares, C. M. A., Carvalho, M. J. and Brigido, M. M. (2005). Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem* 280(26): 24706-24714.

Fernandez, M., Fernandez, E. and Rodicio, R. (1994). ACR1, a gene encoding a protein related to mitochondrial carriers, is essential for acetyl-CoA synthetase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 242(6): 727-735.

Ferreira, M. E., Marques Edos, R., Malavazi, I., Torres, I., Restrepo, A., Nunes, L. R., de Oliveira, R. C., Goldman, M. H. and Goldman, G. H. (2006). Transcriptome analysis and molecular studies on sulfur metabolism in the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mol Genet Genomics* 276(5): 450-463.

Ferreira, M. S. (2009). Paracoccidioidomycosis. *Paediatr Respir Rev* 10(4): 161-165.

Florio, A. R., Ferrari, S., De Carolis, E., Torelli, R., Fadda, G., Sanguinetti, M., Sanglard, D. and Posteraro, B. (2011). Genome-wide expression profiling of the response to short-term exposure to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* serotype A. *BMC Microbiol* 11: 97.

Floss, H. G., Onderka, D. K. and Carroll, M. (1972). Stereochemistry of the 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthetase reaction and the chorismate synthetase reaction. *J Biol Chem* 247(3): 736-744.

Franco, M., Peracoli, M. T., Soares, A., Montenegro, R., Mendes, R. P. and Meira, D. A. (1993). Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol* 5: 115-149.

Freshney, R. (1987). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. New York, Alan R. Liss, Inc.

Fritz, S., Weinbach, N. and Westermann, B. (2003). Mdm30 is an F-box protein required for maintenance of fusion-competent mitochondria in yeast. *Mol Biol Cell* 14(6): 2303-2313.

Furtado, J. S., de Brito, T. and Freymuller, E. (1967). The structure and reproduction of *Paracoccidioides brasiliensis* in human tissue. *Sabouraudia* 5(3): 226-229.

Gamberi, T., Cavalieri, D., Magherini, F., Mangoni, M. L., De Filippo, C., Borro, M., Gentile, G., Simmaco, M. and Modesti, A. (2007). An integrated analysis of the effects of Esculentin 1-21 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1774(6): 688-700.

Garcia, A. M., Hernandez, O., Aristizabal, B. H., De Souza Bernardes, L. A., Puccia, R., Naranjo, T. W., Goldman, G. H., Goldman, M. H., Cano, L. E., Restrepo, A. and McEwen, J. G. (2009). Gene expression analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* transition from conidium to yeast cell. *Med Mycol*: 1-9.

Gautam, P., Shankar, J., Madan, T., Sirdeshmukh, R., Sundaram, C. S., Gade, W. N., Basir, S. F. and Sarma, P. U. (2008). Proteomic and transcriptomic analysis of *Aspergillus fumigatus* on exposure to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 52(12): 4220-4227.

Ghannoum, M. A. and Rice, L. B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 12(4): 501-517.

Gonzalez, A., Gomez, B. L., Diez, S., Hernandez, O., Restrepo, A., Hamilton, A. J. and Cano, L. E. (2005). Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. *Infect Immun* 73(4): 2486-2495.

Gonzalez, A., Lenzi, H. L., Motta, E. M., Caputo, L., Restrepo, A. and Cano, L. E. (2008). Expression and arrangement of extracellular matrix proteins in the lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Int J Exp Pathol* 89(2): 106-116.

Grau, S. and Mateu-De Antonio, J. (2003). Comment: caspofungin acetate for treatment of invasive fungal infections. *Ann Pharmacother* 37(12): 1919.

Grose, E. and Tamsitt, J. R. (1965). *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. *Sabouraudia* 4(2): 124-125.

Gupta, R. S. and Golding, G. B. (1993). Evolution of HSP70 gene and its implications regarding relationships between archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. *J Mol Evol* 37(6): 573-582.

Hahn-Hagerdal, B., Karhumaa, K., Jeppsson, M. and Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 108: 147-177.

Hahn, R. C. and Hamdan, J. S. (2000). In vitro susceptibilities of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form to antifungal drugs. *Mycoses* 43(11-12): 403-407.

Hahn, R. C., Morato Conceicao, Y. T., Santos, N. L., Ferreira, J. F. and Hamdan, J. S. (2003). Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. *Mycoses* 46(8): 342-347.

Hamilton, A. J. and Gomez, B. L. (2002). Melanins in fungal pathogens. *J Med Microbiol* 51(3): 189-191.

Hanafy, A., Uno, J., Mitani, H., Kang, Y. and Mikami, Y. (2007). In-vitro antifungal activities of sulfa drugs against clinical isolates of *Aspergillus* and *Cryptococcus* species. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 48(1): 47-50.

Hermann, G. J., Thatcher, J. W., Mills, J. P., Hales, K. G., Fuller, M. T., Nunnari, J. and Shaw, J. M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol* 143(2): 359-373.

Hoehamer, C. F., Cummings, E. D., Hilliard, G. M. and Rogers, P. D. (2010). Changes in the proteome of *Candida albicans* in response to azole, polyene, and echinocandin antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 54(5): 1655-1664.

Hooshdaran, M. Z., Hilliard, G. M. and Rogers, P. D. (2005). Application of proteomic analysis to the study of azole antifungal resistance in *Candida albicans*. *Methods Mol Med* 118: 57-70.

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

Hubank, M. and Schatz, D. G. (1994). Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* 22(25): 5640-5648.

Johnson, W. D. and Lang, C. M. (1977). Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) in a *squirrel monkey* (*Saimiri sciureus*). *Vet Pathol* 14(4): 368-371.

Kalmar, B. and Greensmith, L. (2009). Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv Drug Deliv Rev* 61(4): 310-318.

Kanehisa, M. and Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28(1): 27-30.

Kastanos, E. K., Woldman, Y. Y. and Appling, D. R. (1997). Role of mitochondrial and cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase isozymes in de novo purine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 36(48): 14956-14964.

Kelly, S. L., Arnoldi, A. and Kelly, D. E. (1993). Molecular genetic analysis of azole antifungal mode of action. *Biochem Soc Trans* 21(4): 1034-1038.

Kim, H., Yoon, S. C., Lee, T. Y. and Jeong, D. (2009). Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. *Toxicol Lett* 184(1): 13-17.

Kley, N. (2004). Chemical dimerizers and three-hybrid systems: scanning the proteome for targets of organic small molecules. *Chem Biol* 11(5): 599-608.

Knaggs, A. R. (2001). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat Prod Rep* 18(3): 334-355.

Komatsu, T., Salih, E., Helmerhorst, E. J., Offner, G. D. and Oppenheim, F. G. (2011). Influence of histatin 5 on *Candida albicans* mitochondrial protein expression assessed by quantitative mass spectrometry. *J Proteome Res* 10(2): 646-655.

Krcmery, V. C., Jr. (2005). Antifungal chemotherapeutics. *Med Princ Pract* 14(3): 125-135.

Kurokawa, C. S., Sugizaki, M. F. and Peracoli, M. T. (1998). Virulence factors in fungi of systemic mycoses. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 40(3): 125-135.

Lee, R. E., Liu, T. T., Barker, K. S., Lee, R. E. and Rogers, P. D. (2005). Genome-wide expression profiling of the response to ciclopirox olamine in *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 55(5): 655-662.

Liu, S., Sun, Y., Li, W., Yu, H., Li, X., Liu, Z., Zeng, J., Zhou, Y., Chen, C. and Jia, J. (2010). The antibacterial mode of action of allitridi for its potential use as a

therapeutic agent against *Helicobacter pylori* infection. FEMS Microbiol Lett 303(2): 183-189.

Liu, T. T., Lee, R. E., Barker, K. S., Wei, L., Homayouni, R. and Rogers, P. D. (2005). Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother 49(6): 2226-2236.

Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H. and Schubert, D. (1997). Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. J Neurochem 69(2): 581-593.

Lopez, A., Parsons, A. B., Nislow, C., Giaever, G. and Boone, C. (2008). Chemical-genetic approaches for exploring the mode of action of natural products. Prog Drug Res 66: 237, 239-271.

Lupetti, A., Danesi, R., Campa, M., Del Tacca, M. and Kelly, S. (2002). Molecular basis of resistance to azole antifungals. Trends Mol Med 8(2): 76-81.

Maertens, J. A. (2004). History of the development of azole derivatives. Clin Microbiol Infect 10 Suppl 1: 1-10.

Magasanik, B. (1992). Regulation of nitrogen utilization. In The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: gene expression. E. W. Jones, J. R. Pringle and J. R. Broach. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 283-317.

Maggio-Hall, L. A. and Keller, N. P. (2004). Mitochondrial beta-oxidation in *Aspergillus nidulans*. Mol Microbiol 54(5): 1173-1185.

Maggio-Hall, L. A., Lyne, P., Wolff, J. A. and Keller, N. P. (2008). A single acyl-CoA dehydrogenase is required for catabolism of isoleucine, valine and short-chain fatty acids in *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet Biol 45(3): 180-189.

Marques, E. R., Ferreira, M. E., Drummond, R. D., Felix, J. M., Menossi, M., Savoldi, M., Travassos, L. R., Puccia, R., Batista, W. L., Carvalho, K. C., Goldman, M. H. and Goldman, G. H. (2004). Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. Mol Genet Genomics 271(6): 667-677.

Marques, S. A. (1998). Paracoccidioidomicose. An Bras Dermatol 73(5): 455-469.

Martinez, R. (2010). Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 43(4): 480.

Matuszewska, E., Kwiatkowska, J., Kuczynska-Wisnik, D. and Laskowska, E. (2008). *Escherichia coli* heat-shock proteins lbpA/B are involved in resistance to oxidative stress induced by copper. *Microbiology* 154(Pt 6): 1739-1747.

Matute, D. R., McEwen, J. G., Puccia, R., Montes, B. A., San-Blas, G., Bagagli, E., Rauscher, J. T., Restrepo, A., Morais, F., Nino-Vega, G. and Taylor, J. W. (2006). Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* 23(1): 65-73.

McEwen, J. G., Bedoya, V., Patino, M. M., Salazar, M. E. and Restrepo, A. (1987). Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol* 25(3): 165-175.

Mendes-Giannini, M. J., Hanna, S. A., da Silva, J. L., Andreotti, P. F., Vincenzi, L. R., Benard, G., Lenzi, H. L. and Soares, C. P. (2004). Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. *Microbes Infect* 6(10): 882-891.

Miyaji, M. and Kamei, K. (2003). Imported mycoses: an update. *J Infect Chemother* 9(2): 107-113.

Morejon, K. M., Machado, A. A. and Martinez, R. (2009). Paracoccidioidomycosis in patients infected with and not infected with human immunodeficiency virus: a case-control study. *Am J Trop Med Hyg* 80(3): 359-366.

Moukhlis, R., Boyer, J., Lacube, P., Bolognini, J., Roux, P. and Hennequin, C. (2010). Linking *Pneumocystis jirovecii* sulfamethoxazole resistance to the alleles of the DHPS gene using functional complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Clin Microbiol Infect* 16(5): 501-507.

Nakai, T., Uno, J., Ikeda, F., Tawara, S., Nishimura, K. and Miyaji, M. (2003). In vitro antifungal activity of Micafungin (FK463) against dimorphic fungi: comparison of yeast-like and mycelial forms. *Antimicrob Agents Chemother* 47(4): 1376-1381.

Nemecek, J. C., Wuthrich, M. and Klein, B. S. (2006). Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science* 312(5773): 583-588.

Neto, B. R. S., de Fatima da Silva, J., Mendes-Giannini, M. J., Lenzi, H. L., Soares, C. M. A. and Pereira, M. (2009). The malate synthase of *Paracoccidioides*

brasiliensis is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. BMC Microbiol 9: 272.

Nichols, B. P., Seibold, A. M. and Doktor, S. Z. (1989). para-aminobenzoate synthesis from chorismate occurs in two steps. J Biol Chem 264(15): 8597-8601.

Palmieri, L., Lasorsa, F. M., De Palma, A., Palmieri, F., Runswick, M. J. and Walker, J. E. (1997). Identification of the yeast ACR1 gene product as a succinate-fumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate. FEBS Lett 417(1): 114-118.

Paniago, A. M., de Freitas, A. C., Aguiar, E. S., Aguiar, J. I., da Cunha, R. V., Castro, A. R. and Wanke, B. (2005). Paracoccidioidomycosis in patients with human immunodeficiency virus: review of 12 cases observed in an endemic region in Brazil. J Infect 51(3): 248-252.

Pastorian, K., Hawel, L., 3rd and Byus, C. V. (2000). Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. Anal Biochem 283(1): 89-98.

Patel, O., Karnik, K. and Macreadie, I. G. (2004a). Over-production of dihydrofolate reductase leads to sulfa-dihydropteroate resistance in yeast. FEMS Microbiol Lett 236(2): 301-305.

Patel, O. G., Mberu, E. K., Nzila, A. M. and Macreadie, I. G. (2004b). Sulfa drugs strike more than once. Trends Parasitol 20(1): 1-3.

Peres da Silva, R., Matsumoto, M. T., Braz, J. D., Voltan, A. R., de Oliveira, H. C., Soares, C. P. and Mendes Giannini, M. J. (2011). Differential gene expression analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* during keratinocyte infection. J Med Microbiol 60(Pt 3): 269-280.

Pinzan, C. F., Ruas, L. P., Casabona-Fortunato, A. S., Carvalho, F. C. and Roque-Barreira, M. C. (2010). Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. PLoS One 5(5): e10757.

Pontes, H. A., Guimaraes, D. M., Pontes, F. S., Paiva, H. B., Pinto, L. C., de Freitas Silva, B. S. and Dos Santos Pinto, D., Jr. (2011). Kaposi sarcoma and paracoccidioidomycosis in the same fragment of oral mucosa biopsy: a rare association in human immunodeficiency virus-positive patient. A case report. Diagn Microbiol Infect Dis 69(2): 196-199.

Prado, M., da Silva, M. B., Laurenti, R., Travassos, L. R. and Taborda, C. P. (2009). Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(3): 513-521.

Queiroz-Telles, F. (1994). *Paracoccidioides brasiliensis* ultrastructural Findings. Paracoccidioidomycosis. M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno and G. Del Negro. London, CRC Press: 27–44.

Ramon De Lucas, J., Martinez, O., Perez, P., Isabel Lopez, M., Valenciano, S. and Laborda, F. (2001). The *Aspergillus nidulans* carnitine carrier encoded by the acuH gene is exclusively located in the mitochondria. *FEMS Microbiol Lett* 201(2): 193-198.

Ramos, E. S. M. and Saraiva, L. E. (2008). Paracoccidioidomycosis. *Dermatol Clin* 26(2): 257-269, vii.

Ratledge, C. and Dover, L. G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 54: 881-941.

Reinoso, C., Nino-Vega, G., San-Blast, G. and Dominguez, A. (2005). Random sequencing of *Paracoccidioides brasiliensis* genes. *Med Mycol* 43(8): 681-689.

Restrepo-Moreno, A. (2003). Paracoccidioidomycosis. *Clinical Mycology*. W. E. Dismukes, P. G. Pappas and J. Sobel. New York, Oxford University Press: 328–345.

Restrepo, A. (1985). The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia* 23(5): 323-334.

Restrepo, A. and Jimenez, B. E. (1980). Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *J Clin Microbiol* 12(2): 279-281.

Restrepo, A., McEwen, J. G. and Castaneda, E. (2001). The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol* 39(3): 233-241.

Restrepo, A., Salazar, M. E., Cano, L. E., Stover, E. P., Feldman, D. and Stevens, D. A. (1984). Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 46(2): 346-353.

Restrepo, A. and Tabares Cde, B. (1984). In vitro susceptibility of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form to antifungal agents. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 26(6): 322-328.

Restrepo, A. and Tobon, A. (2005). *Paracoccidioides brasiliensis*. Principles and Practice of infectious diseases. G. L. Mandell, J. E. Bennet and R. Dollin. Philadelphia: 3062-3068.

Ribeiro, A. M., Bocca, A. L., Amaral, A. C., Souza, A. C., Faccioli, L. H., Coelho-Castelo, A. A., Figueiredo, F., Silva, C. L. and Felipe, M. S. (2010). HSP65 DNA as therapeutic strategy to treat experimental paracoccidioidomycosis. *Vaccine* 28(6): 1528-1534.

Ribeiro, L. C., Hahn, R. C., Favalessa, O. C., Tadano, T. and Fontes, C. J. (2009). [Systemic mycosis: factors associated with death among patients infected with the human immunodeficiency virus, Cuiaba, State of Mato Grosso, Brazil, 2005-2008]. *Rev Soc Bras Med Trop* 42(6): 698-705.

Richini-Pereira, V. B., Bosco Sde, M., Griese, J., Theodoro, R. C., Macoris, S. A., da Silva, R. J., Barrozo, L., Tavares, P. M., Zancope-Oliveira, R. M. and Bagagli, E. (2008). Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol* 46(1): 35-40.

Rivitti, E. A. and Aoki, V. (1999). Deep fungal infections in tropical countries. *Clin Dermatol* 17(2): 171-190; discussion 105-176.

Rogers, P. D., Vermitsky, J. P., Edlind, T. D. and Hilliard, G. M. (2006). Proteomic analysis of experimentally induced azole resistance in *Candida glabrata*. *J Antimicrob Chemother* 58(2): 434-438.

Roussel, D., Harding, M., Runswick, M. J., Walker, J. E. and Brand, M. D. (2002). Does any yeast mitochondrial carrier have a native uncoupling protein function? *J Bioenerg Biomembr* 34(3): 165-176.

San-Blas, G. and Niño-Vega, G. (2008). *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. *Mycopathologia* 165(4-5): 183-195.

San-Blas, G., Nino-Vega, G. and Iturriaga, T. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* 40(3): 225-242.

Sanglard, D. (2002). Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr Opin Microbiol* 5(4): 379-385.

Santos, G. D., Ferri, P. H., Santos, S. C., Bao, S. N., Soares, C. M. A. and Pereira, M. (2007). Oenothrin B inhibits the expression of PbFKS1 transcript and induces morphological changes in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* 45(7): 609-618.

Shikanai-Yasuda, M. A., Telles Filho Fde, Q., Mendes, R. P., Colombo, A. L. and Moretti, M. L. (2006). [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. *Rev Soc Bras Med Trop* 39(3): 297-310.

Sigle, H. C., Thewes, S., Niewerth, M., Korting, H. C., Schafer-Korting, M. and Hube, B. (2005). Oxygen accessibility and iron levels are critical factors for the antifungal action of ciclopirox against *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 55(5): 663-673.

Silva-Vergara, M. L., Teixeira, A. C., Curi, V. G., Costa Junior, J. C., Vanunce, R., Carmo, W. M. and Silva, M. R. (2003). Paracoccidioidomycosis associated with human immunodeficiency virus infection. Report of 10 cases. *Med Mycol* 41(3): 259-263.

Silva, A. P., Miranda, I. M., Guida, A., Synnott, J., Rocha, R., Silva, R., Amorim, A., Pina-Vaz, C., Butler, G. and Rodrigues, A. G. (2011a). Transcriptional profiling of azole-resistant *Candida* parapsilosis strains. *Antimicrob Agents Chemother* 55(7): 3546-3556.

Silva, M. G., Schrank, A., Bailao, E. F. L. C., Bailao, A. M., Borges, C. L., Staats, C. C., Parente, J. A., Pereira, M., Izacc, S. M., Giannini, M. J., Zancope-Oliveira, R. M., Rosa e Silva, L. K., Nosanchuk, J. D., Henning Vainstein, M. and Soares, C. M. A. (2011b). The homeostasis of iron, copper and zinc in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* var. *grubi*, and *Cryptococcus gatii*: a comparative analysis. *Frontiers in Microbiology* 2: 12.

Slater, T. F., Sawyer, B. and Straeuli, U. (1963). Studies on Succinate-Tetrazolium Reductase Systems. Iii. Points of Coupling of Four Different Tetrazolium Salts. *Biochim Biophys Acta* 77: 383-393.

Squina, F. M., Leal, J., Cipriano, V. T., Martinez-Rossi, N. M. and Rossi, A. (2010). Transcription of the *Neurospora crassa* 70-kDa class heat shock protein genes is modulated in response to extracellular pH changes. *Cell Stress Chaperones* 15(2): 225-231.

Strom, K., Schnurer, J. and Melin, P. (2005). Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression. *FEMS Microbiol Lett* 246(1): 119-124.

Taborda, C. P., da Silva, M. B., Nosanchuk, J. D. and Travassos, L. R. (2008). Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia* 165(4-5): 331-339.

Tavares, A. H., Silva, S. S., Dantas, A., Campos, E. G., Andrade, R. V., Maranhao, A. Q., Brigido, M. M., Passos-Silva, D. G., Fachin, A. L., Teixeira, S. M., Passos, G. A., Soares, C. M. A., Bocca, A. L., Carvalho, M. J., Silva-Pereira, I. and Felipe, M. S. (2007). Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbes Infect* 9(5): 583-590.

Teixeira, M. M., Theodoro, R. C., de Carvalho, M. J., Fernandes, L., Paes, H. C., Hahn, R. C., Mendoza, L., Bagagli, E., San-Blas, G. and Felipe, M. S. (2009). Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol* 52(2): 273-283.

Terrell, C. L. (1999). Antifungal agents. Part II. The azoles. *Mayo Clin Proc* 74(1): 78-100.

Tomazett, P. K., Castro Nda, S., Lenzi, H. L., de Almeida Soares, C. M. A. and Pereira, M. (2011). Response of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 to stressor agents and cell wall osmoregulators. *Fungal Biol* 115(1): 62-69.

Tomazett, P. K., Felix, C. R., Lenzi, H. L., de Paula Faria, F., de Almeida Soares, C. M. and Pereira, M. (2010). 1,3-beta-d-Glucan synthase of *Paracoccidioides brasiliensis*: recombinant protein, expression and cytolocalization in the yeast and mycelium phases. *Fungal Biol* 114(10): 809-816.

Travassos, L. R., Taborda, C. P. and Colombo, A. L. (2008). Treatment options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. *Expert Rev Anti Infect Ther* 6(2): 251-262.

Tzagoloff, A. and Shtanko, A. (1995). Mitochondrial and cytoplasmic isoleucyl-, glutamyl- and arginyl-tRNA synthetases of yeast are encoded by separate genes. *Eur J Biochem* 230(2): 582-586.

Valera, E. T., Mori, B. M., Engel, E. E., Costa, I. S., Brandao, D. F., Nogueira-Barbosa, M. H., Queiroz, R. G., Silveira, V. D., Scrideli, C. A. and Tone, L. G. (2008). Fungal infection by *Paracoccidioides brasiliensis* mimicking bone tumor. *Pediatr Blood Cancer*.

van Roermund, C. W., Hetteema, E. H., van den Berg, M., Tabak, H. F. and Wanders, R. J. (1999). Molecular characterization of carnitine-dependent transport of acetyl-CoA from peroxisomes to mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of a plasma membrane carnitine transporter, Agp2p. *EMBO J* 18(21): 5843-5852.

Villar, L. A., Salazar, M. E. and Restrepo, A. (1988). Morphological study of a variant of *Paracoccidioides brasiliensis* that exists in the yeast form at room temperature. *J Med Vet Mycol* 26(5): 269-276.

Viscoli, C., Girmenia, C., Marinus, A., Collette, L., Martino, P., Vandercam, B., Doyen, C., Lebeau, B., Spence, D., Krcmery, V., De Pauw, B. and Meunier, F. (1999). Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Clin Infect Dis* 28(5): 1071-1079.

Waldorf, A. R. and Polak, A. (1983). Mechanisms of action of 5-fluorocytosine. *Antimicrob Agents Chemother* 23(1): 79-85.

Wang, D., Yu, L., Xiang, H., Fan, J., He, L., Guo, N., Feng, H. and Deng, X. (2008). Global transcriptional profiles of *Staphylococcus aureus* treated with berberine chloride. *FEMS Microbiol Lett* 279(2): 217-225.

Wintersberger, U. and Hirsch, J. (1973). Induction of cytoplasmic respiratory deficient mutants on yeast by the folic acid analogue, methotrexate. II. Genetic analysis of the methotrexate-induced petites. *Mol Gen Genet* 126(1): 71-74.

Woyke, T., Berens, M. E., Hoelzinger, D. B., Pettit, G. R., Winkelmann, G. and Pettit, R. K. (2004). Differential gene expression in auristatin PHE-treated *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 48(2): 561-567.

Xu, Y., Wang, Y., Yan, L., Liang, R. M., Dai, B. D., Tang, R. J., Gao, P. H. and Jiang, Y. Y. (2009). Proteomic analysis reveals a synergistic mechanism of fluconazole and berberine against fluconazole-resistant *Candida albicans*: endogenous ROS augmentation. *J Proteome Res* 8(11): 5296-5304.

Yang, S., Cha, J. and Carlson, K. (2005). Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1097(1-2): 40-53.

Yasuda, M. A. (2005). Pharmacological management of paracoccidioidomycosis. *Expert Opin Pharmacother* 6(3): 385-397.

Yu, L., Zhang, W., Liu, T., Wang, X., Peng, J., Li, S. and Jin, Q. (2007). Global gene expression of *Trichophyton rubrum* in response to PH11B, a novel fatty acid synthase inhibitor. *J Appl Microbiol* 103(6): 2346-2352.

Zambuzzi-Carvalho, P. F., Cruz, A. H., Santos-Silva, L. K., Goes, A. M., Soares, C. M. A. and Pereira, M. (2009). The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 is required in the glyoxylate cycle and in the allantoin degradation pathway. *Med Mycol* 47(7): 734-744.

Zeng, Y. B., Qian, Y. S., Ma, L. and Gu, H. N. (2007). Genome-wide expression profiling of the response to terbinafine in *Candida albicans* using a cDNA microarray analysis. *Chin Med J (Engl)* 120(9): 807-813.

Zhang, L., Zhang, Y., Zhou, Y., An, S. and Cheng, J. (2002a). Response of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* to amphotericin B and nystatin measured by microarrays. *J Antimicrob Chemother* 49(6): 905-915.

Zhang, L., Zhang, Y., Zhou, Y., Zhao, Y. and Cheng, J. (2002b). Expression profiling of the response of *Saccharomyces cerevisiae* to 5-fluorocytosine using a DNA microarray. *Int J Antimicrob Agents* 20(6): 444-450.

Zhao, R., Bin, W., Diao, Y., Yang, J., Liu, T., Peng, J. and Jin, Q. (2009). Global transcriptional profiles of *Trichophyton rubrum* in response to Flucytosine. *Sci China C Life Sci* 52(12): 1173-1185.

Figures and Tables

Table 1 - Functional classification of genes differentially expressed up-regulated and downregulated upon 1 h and 2 h exposure to sulfamethoxazole.

Functional Classification	Gene product	Best hit/ <i>P. brasiliensis</i> genome locus ^a	e-value	Number of Occurrences	
				1h	2h
Metabolism	Alanine-glyoxylate aminotransferase (AGX1)	PAAG_03138.1	0.0		-1
	Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH)	PAAG_05392.1	0.0	-22	-167
	Cysteine desulfurase (NFS1)	PAAG_05850.1	0.0	-41	-42
	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase (COQ3)	PAAG_06595.1	6.8e-38	-1	
	Dolichyl pyrophosphate Man9GlcNAc2 alpha-1,3-glucosyltransferase (ALG6)	PAAG_01732.1	0.0	-1	
	Fatty acid elongase (GNS1/SUR4)	PAAG_08553.1	1.4e-45	+3	
	Glutamine synthetase (GLN1)	PAAG_07003.1	6.5e-5		+30
	Phospholipase D (PLDc)	PAAG_00220.1	0.0	-2	
	Ribulose-phosphate 3-epimerase (RPE1)	PAAG_01632.1	1.4e-43	+2	
Energy	Acyl-CoA dehydrogenase (ACAD)	PAAG_05211.1	4.6e-15	-1	
	ATP synthase subunit beta (ATP2)	PAAG_08037.1	0.0	-1	

	Carnitine/acyl carnitine carrier (ACUH)	PAAG_03452.1	4.9e-33	-15	
	NADPH dehydrogenase (OYE)	PAAG_08159.1	0.0	-1	
	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase (SCDA)	PAAG_03190.1	5.0e-7	-1	
	Trehalose-phosphatase (TPS2)	PAAG_06703.1	0.0	+1	
Transcription	C6 transcription factor (CTF1B)	PAAG_01359.1	0.0	+45	-13
	Cross-pathway control protein A	PAAG_03094.1	3.2e-27		+1
	Pirin (PIR)	PAAG_04726.1	0.0	-5	
	Ring finger protein (RNF)	PAAG_06129.1	1.4e-22	+2	
	Sexual development transcription factor (NSDD)	PAAG_05818.1	1.1e-44	-16	
	Transcription factor STEA	PAAG_00406.1	0.0	+2	-2
	Transcription factor CCHC	PAAG_02735.1	4.7e-36	+3	
	Trancription factor C2H2	PAAG_07831.1	8.4e-45	-1	
Protein synthesis	ATP-dependent RNA helicase (eIF4A)	PAAG_00689.1	2.5e-43	-8	-8
	40S ribosomal protein S4 (RPS4)	PAAG_03816.1	1.3e-40	-1	
	60S ribossomal protein L7-C (RPL7)	PAAG_06487.1	3.5e-28		+2
	tRNA methyltransferase complex (GCD14)	PAAG_04192.1	0.0	-2	

Protein Fate	Dipeptidase (DPEP)	PAAG_02915.1	7.7e-33	-1	
	Histone deacetylase (RPD3)	PAAG_06472.1	0.0	-1	+1
	Ubiquitin (UBI)	PAAG_07080.1	4.1e-35	-1	
	Ubiquitin interaction motif protein (S5a)	PAAG_04028.1	4.6e-15	-1	
	Ubiquitin thioesterase (OTU1)	PAAG_08841.1	8.3e-36	+2	
Cellular Communication/Signal Transduction Mechanism	Guanine nucleotide-binding protein alpha-1 subunit (GPA2)	PAAG_04436.1	1.2e-34	-2	-16
	GTP-binding protein (RHO2)	PAAG_01879.1	5.7e-23	+1	
	Senescence-associated protein	PABG_06805.1	1.1e-43	-3	+28
Biogenesis of Cellular Components	Transmembrane GTPase (FZO1)	PAAG_02592.1	0.0	-1	
Cell rescue, defense and virulence	CAP20	PAAG_06538.1	0.0	+1	-2
	Heat Shock Protein (HSP)	PAAG_05679.1	3.1e-30	-3	
	Heat Shock Protein (HSP30)	PAAG_00871.1	0.0	-30	+14
	Heat Shock Protein (HSP60)	PAAG_08059.1	0.0		+61
	Heat Shock Protein (HSP70)	PAAG_08003.1	0.0	-3	+52

	Heat Shock Protein (HSP88)	PAAG_07750.1	0.0		+2
	Hemolysin – III (Hly-III)	PAAG_01871.1	3.9e-13	-1	
	Survival factor 1 (SVF1)	PAAG_02425.1	4.6e-26	-1	
Cellular transport, transport facilities and transport routes	ABC transporter	PAAG_04548.1	2.4e-43	+9	
	ADP/ATP carrier protein (AAC)	PAAG_08620.1	5.8e-11	+1	
	Dicarboxylic amino acid permease (DIP5)	PAAG_04187.1	3.1e-22	-4	
	Major Facilitator Superfamily transporter (MFS)	PAAG_01353.1	9e-45	+13	-8
	Stomatin family protein	PAAG_06541.1	8.9e-43	-1	
	Succinate/fumarate mitochondrial transporter (ACR1)	PAAG_06563.1	2.7e-44	-2	+3
	Vesicular-fusion protein (SEC17)	PAAG_06233.1	0.0	-1	
Cell cycle and DNA processing	Beta-lactamase family protein (PSO2)	PAAG_01244.1	6.29e-20	-1	
	Ribonuclease reductase large subunit (RNR1)	PAAG_02210.1	2.8e-44	-12	
Functional unclassified proteins	DHHC domain	PAAG_06616.1	2.5e-43	-2	
	Protein lysine-rich. 'Pleckstrin Homology' (PH) domain	PAAG_03092.1	0.0	+7	+7

Unclassified protein	Conserved Hypothetical Protein	PAAG_05467.1	5.1e-22	-4	
	Conserved Hypothetical Protein	PADG_08536.1	9.7e-8	-1	
	Conserved Hypothetical Protein	PADG_08537.1	3.7e-5	-1	+5
	Conserved hypothetical protein	PAAG_08906.1	2.0e-23		+5
	Conserved Hypothetical Protein	PAAG_04190.1	0.0	-1	-1
	Hypothetical Protein	PAAG_04118.1	4.8e-28		+1
	Hypothetical Protein	PAAG_05009.1	0.0	+2	
	Hypothetical Protein	PAAG_06820.1	1.9e-21	+8	+49
	Hypothetical Protein	PAAG_07684.1	5.8e-25	-1	
	Hypothetical Protein	PABG_01099.1	7.2e-26	-2	
	Hypothetical Protein	PABG_06807.1	5.9e-12	-4	

^a Accesion number at Broad Institute (<http://www.broadinstitute.org>).

Supplementary Table 1 – Oligonucleotide primers used in RDA assay and qRT-PCR

Sequence Name	Foward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Reaction
cDNA	AGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG		Synthesis of the first-strand
CDS	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT (30) N1N ^a		Synthesis of the first-strand
PCRII	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT		Synthesis of the second-strand
JBam12,24	GATCCGTTTCATG	ACCGACGTCGACTATCCATGAACG	Adapter 1 (RDA)
NBam12,24	GATCCTCCCTCG	AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG	Adapter 2 (RDA)
RBam12,24	GATCCTCGGTGA	AGCACTCTCCAGCCTCTCTCACCGAG	Adapter 3 (RDA)
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC		Sequencing
Glutamine Synthetase (GLN1)	CGATCAAAAACAAAGACCCT	GGTCTGGGTACATGGCAAC	qRT-PCR
D-ribulose 5-phosphate 3-epimerase (RPE1)	CAATGGATCGACCTGATATGG	GACCTCCGTCAACTTCGATG	qRT-PCR
ATP synthase beta subunit (ATP2)	GCTATGGATGGTACCGAGG	TTGATACCAGTAACCAGGAC	qRT-PCR
ADP/ATP carrier protein (AAC)	ACTTGGCTTCTGGTGGTGCT	ACGCGAGGGTCTTTCTGTAG	qRT-PCR
Succinate/Fumarate mitochondrial transporter (ACR1)	GGGGTAAAACCTCGAGGCTT	AAAGTTGTCCGGTCTCCTTGT	qRT-PCR
Short Chain Acyl CoA dehydrogenase (SCDA)	AGGGTACCACTCCGTATACTA	GTCCCGCAAGGTATCCTCG	qRT-PCR
Acyl-CoA dehydrogenase (ACAD)	GAGAACGAGACGCCCGAAG	GTTGTAGTAAGGACTCTTGTAG	qRT-PCR
3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase (COQ3)	CCCTCACACAAAATCCACATC	TGTCCGTCGATAATGAATGAGA	qRT-PCR
Ubiquitin (UBI)	GGAGGCATGCAGATCTTCGT	ACGACCGTCCTCAAGCTGC	qRT-PCR
Carnitine/Acyl-Carnitine carrier (ACUH)	GAAGGCATTGCCAGGGGGT	CATTATGAACGGGGACGGTG	qRT-PCR
NADPH dehydrogenase (OYE)	GGGCTGTCTCCACTATGTCA	CGCTGCTTCCGTCATGATAAA	qRT-PCR
Transmembrane GTPase (FZO1)	CATGTCCATCAATTGTTATACAA	ATCTCACTCCCATCCATCGC	qRT-PCR

Dihydropteroate synthase (DHPS)	TGCGACCGCTTTGCCAACTT	GGGTGAGGGGTGGGAGATG	qRT-PCR
Dihydrofolate reductase (DHFR)	CTTCGACGGGGTAATTGGCT	GCAGTGGTTGTGGTGGTGAT	qRT-PCR

^a (N1 = A, G or C / N = A, C, G or T)

Figure 1

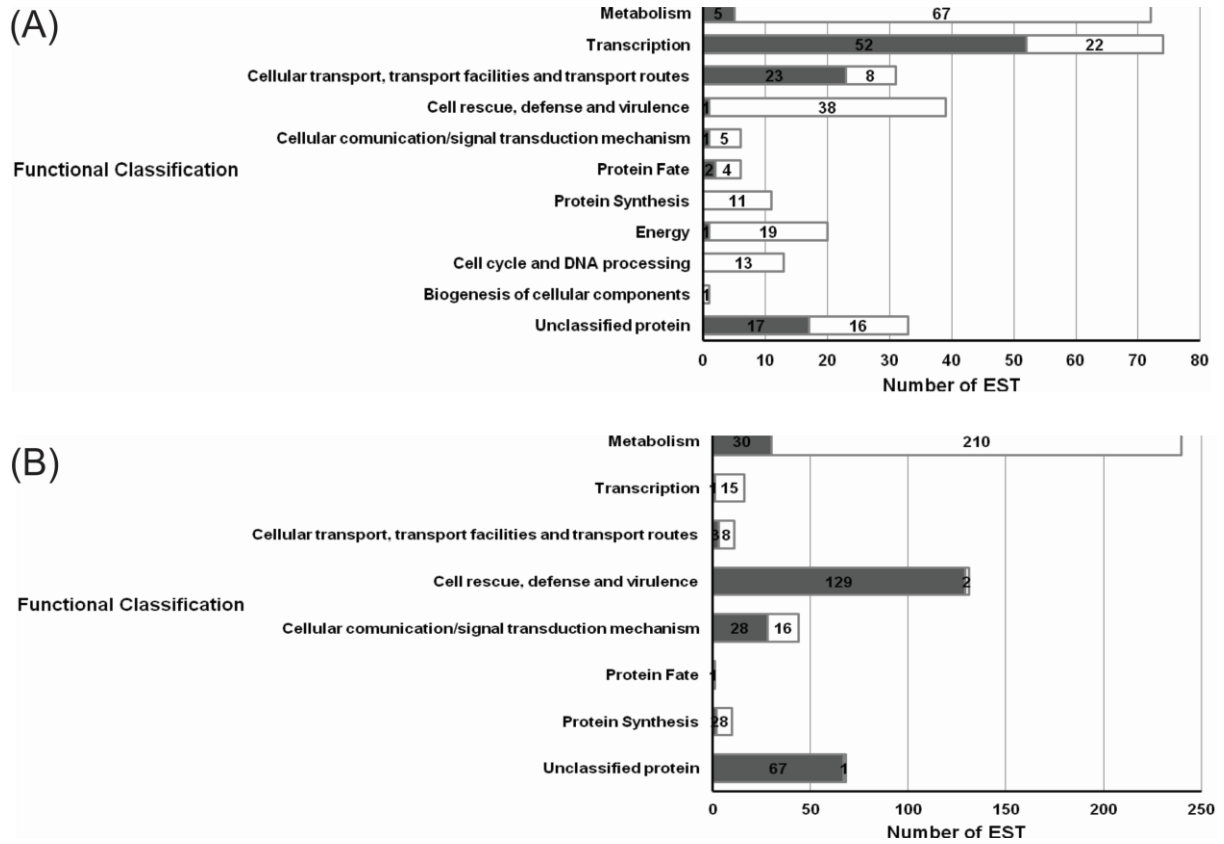


Figure 2

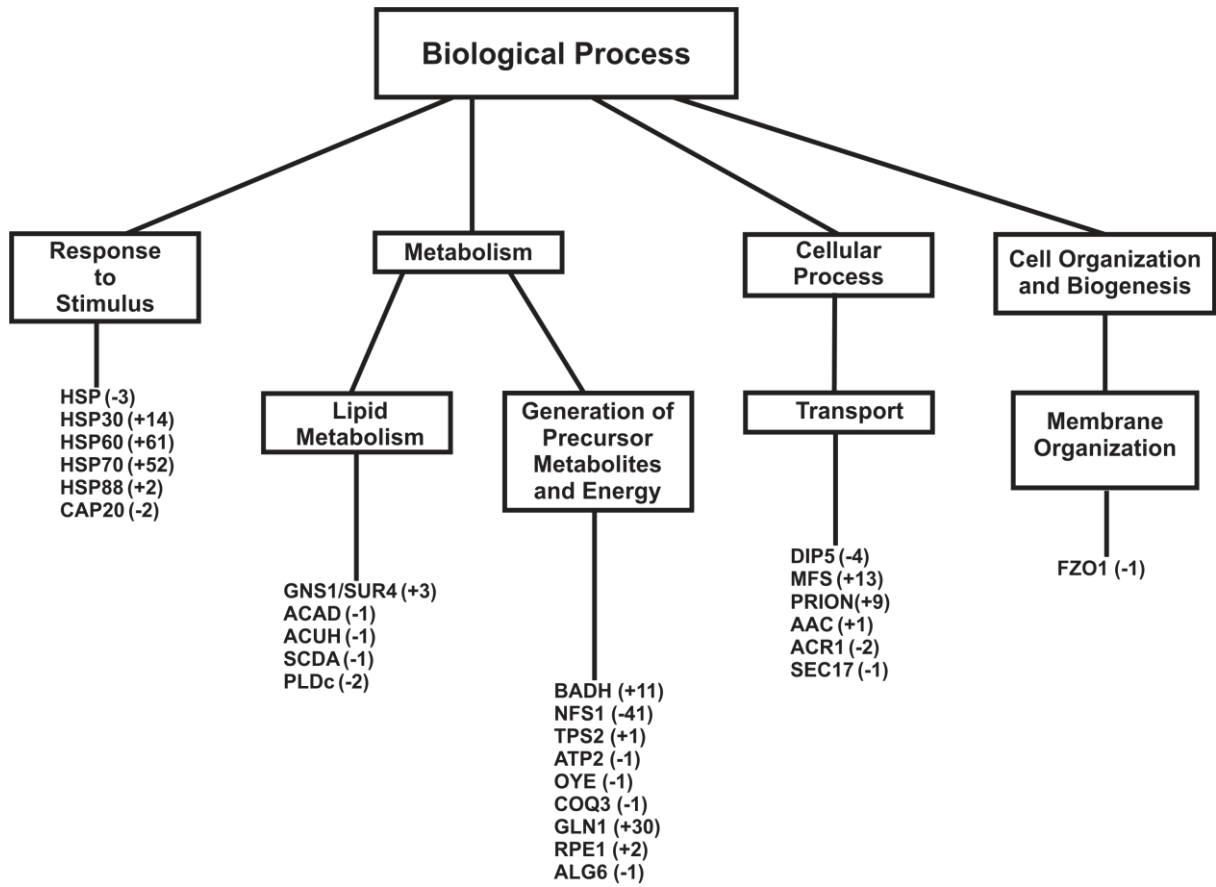


Figure 3

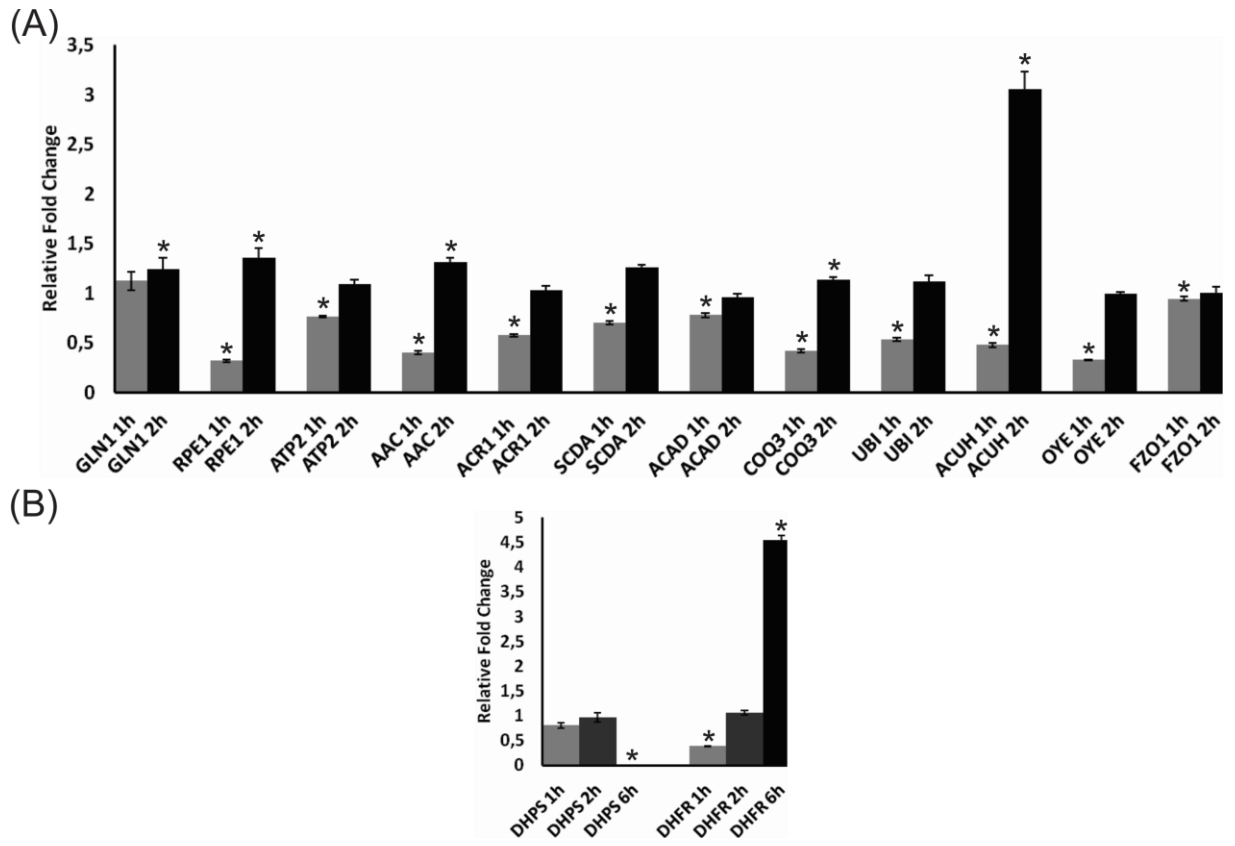


Figure 4

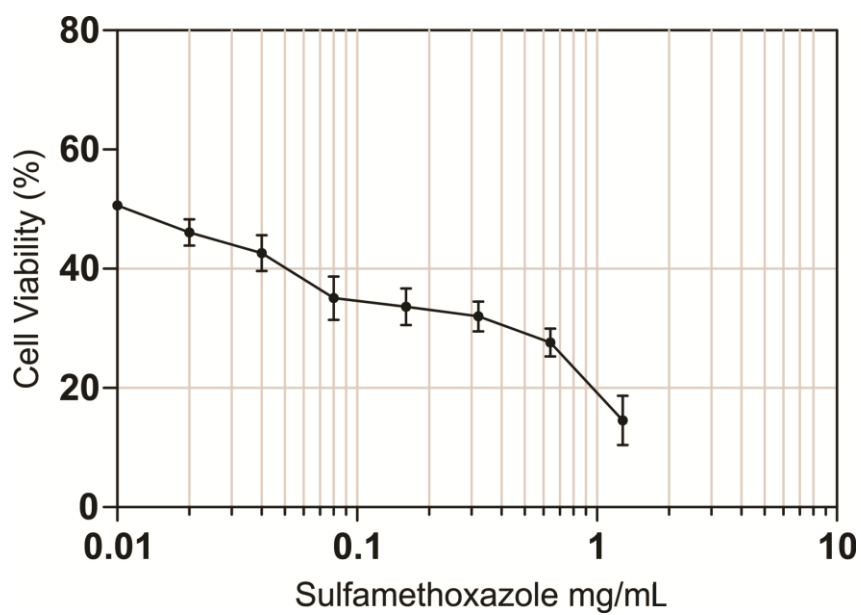
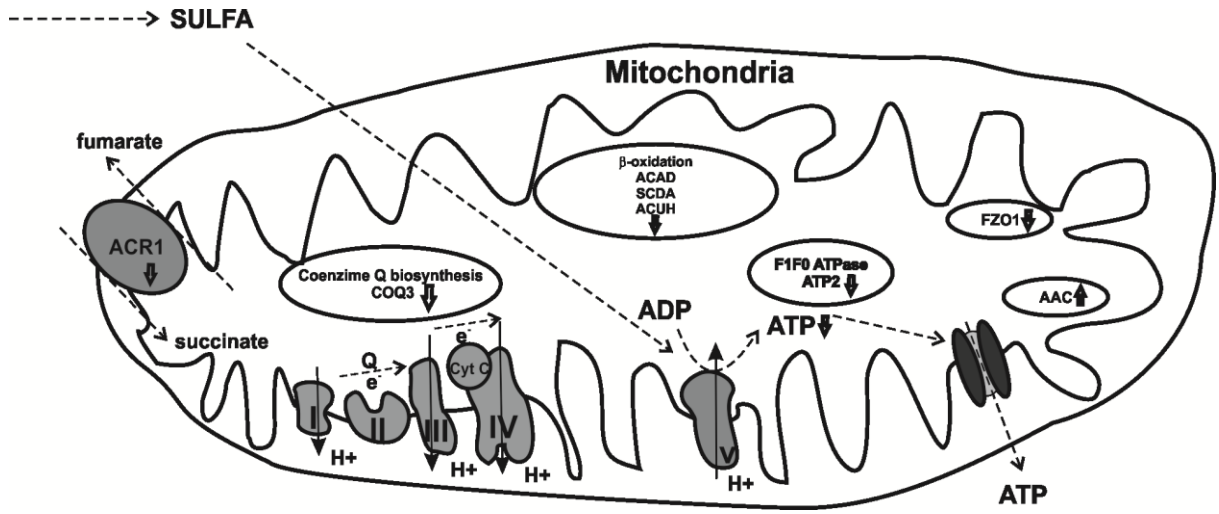
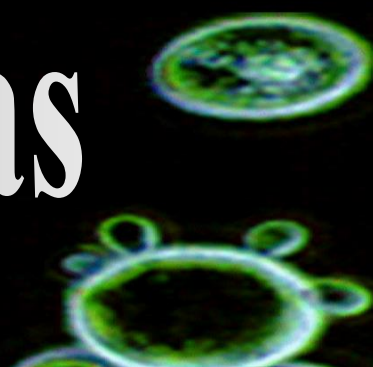


Figure 5



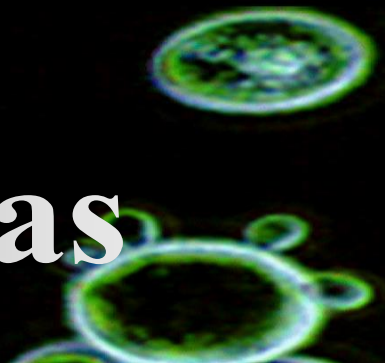
Perspectivas



4 - PERSPECTIVAS

- i – Realizar um estudo proteômico do mecanismo de ação de sulfametoxazol para futura análise comparativa com o transcritoma de *P. brasiliensis*;
- ii – Realizar um estudo proteômico das proteínas mitocondriais isoladas de *P. brasiliensis* tratados com sulfametoxazol;
- iii – Realizar ensaios que avaliem o comprometimento das funções mitocondriais isoladas de *P. brasiliensis* após tratamento com sulfametoxazol;
- iv – Realizar análises proteômicas e avaliação da atividade mitocondrial de *P. brasiliensis* resistentes à sulfametoxazol

Referências Bibliográficas



5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal, A. K., Rogers, P. D., Baerson, S. R., Jacob, M. R., Barker, K. S., Cleary, J. D., Walker, L. A., Nagle, D. G. and Clark, A. M. (2003). Genome-wide expression profiling of the response to polyene, pyrimidine, azole, and echinocandin antifungal agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278(37): 34998-35015.

Angiolella, L., Vitali, A., Stringaro, A., Mignogna, G., Maras, B., Bonito, M., Colone, M., Palamara, A. T. and Cassone, A. (2009). Localisation of Bgl2p upon antifungal drug treatment in *Candida albicans*. *Int J Antimicrob Agents* 33(2): 143-148.

Arikan, S., Sancak, B. and Hascelik, G. (2005). In vitro activity of caspofungin compared to amphotericin B, fluconazole, and itraconazole against *Candida* strains isolated in a Turkish University Hospital. *Med Mycol* 43(2): 171-178.

Bagagli, E., Bosco, S. M., Theodoro, R. C. and Franco, M. (2006). Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Genet Evol* 6(5): 344-351.

Bagagli, E., Theodoro, R. C., Bosco, S. M. and McEwen, J. G. (2008). *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia* 165(4-5): 197-207.

Bailão, A. M., Schrank, A., Borges, C. L., Dutra, V., Molinari-Madlum, E. E. W. I., Felipe, M. S. S., Mendes-Giannini, M. J. S., Martins, W. S., Pereira, M. and Soares, C. M. A. (2006). Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microbes Infect* 8(12-13): 2686-2697.

Bailão, A. M., Shrank, A., Borges, C. L., Parente, J. A., Dutra, V., Felipe, M. S., Fiuza, R. B., Pereira, M. and Soares, C. M. A. (2007). The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51(1): 43-57.

Bammert, G. F. and Fostel, J. M. (2000). Genome-wide expression patterns in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of drug treatments and genetic alterations affecting biosynthesis of ergosterol. *Antimicrob Agents Chemother* 44(5): 1255-1265.

Bastos, K. P., Bailao, A. M., Borges, C. L., Faria, F. P., Felipe, M. S., Silva, M. G., Martins, W. S., Fiuza, R. B., Pereira, M. and Soares, C. M. A. (2007). The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol* 7: 29.

Bertini, S., Colombo, A. L., Takahashi, H. K. and Straus, A. H. (2007). Expression of antibodies directed to *Paracoccidioides brasiliensis* glycosphingolipids during the course of paracoccidioidomycosis treatment. *Clin Vaccine Immunol* 14(2): 150-156.

Borges, C. L., Bailao, A. M., Bao, S. N., Pereira, M., Parente, J. A. and Soares, C. M. A. (2011). Genes potentially relevant in the parasitic phase of the fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* 171(1): 1-9.

Brummer, E., Castaneda, E. and Restrepo, A. (1993). Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 6(2): 89-117.

Bruneau, J. M., Maillet, I., Tagat, E., Legrand, R., Supatto, F., Fudali, C., Caer, J. P., Labas, V., Lecaque, D. and Hodgson, J. (2003). Drug induced proteome changes in *Candida albicans*: comparison of the effect of beta(1,3) glucan synthase inhibitors and two triazoles, fluconazole and itraconazole. *Proteomics* 3(3): 325-336.

Carrero, L. L., Nino-Vega, G., Teixeira, M. M., Carvalho, M. J., Soares, C. M.A., Pereira, M., Jesuino, R. S., McEwen, J. G., Mendoza, L., Taylor, J. W., Felipe, M. S. and San-Blas, G. (2008). New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol* 45(5): 605-612.

Conti-Diaz, I. A. (2007). On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*: our hypothesis of 1989: present status and perspectives. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 49(2): 131-134.

Corte, A. C., Svoboda, W. K., Navarro, I. T., Freire, R. L., Malanski, L. S., Shiozawa, M. M., Ludwig, G., Aguiar, L. M., Passos, F. C., Maron, A., Camargo, Z. P., Itano, E. N. and Ono, M. A. (2007). Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Parana State, Brazil. *Mycopathologia* 164(5): 225-228.

Costa, M., Borges, C. L., Bailao, A. M., Meirelles, G. V., Mendonca, Y. A., Dantas, S. F., de Faria, F. P., Felipe, M. S., Molinari-Madlum, E. E., Mendes-Giannini, M. J., Fiuza, R. B., Martins, W. S., Pereira, M. and Soares, C. M. A. (2007). 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): 4194-4207.

Courchesne, W. E., Tunc, M. and Liao, S. (2009). Amiodarone induces stress responses and calcium flux mediated by the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Microbiol* 55(3): 288-303.

Coutinho, Z. F., Silva, D., Lazera, M., Petri, V., Oliveira, R. M., Sabroza, P. C. and Wanke, B. (2002). Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica* 18(5): 1441-1454.

Da Lacaz, C. S., Ulson, C. M. and De Prado Sampaio, S. A. (1959). [In vitro action of amphotericin B on *Paracoccidioides brasiliensis*]. *Rev Paul Med* 54(5): 357-360.

da Silva Castro, N., Barbosa, M. S., Maia, Z. A., Bao, S. N., Felipe, M. S., Santana, J. M., Soares Mendes-Giannini, M. J., Pereira, M. and Soares, C. M. A. (2008). Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* PbDfg5p, a cell-wall protein implicated in filamentous growth. *Yeast* 25(2): 141-154.

da Silva, M. B., Marques, A. F., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., Travassos, L. R. and Taborda, C. P. (2006). Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect* 8(1): 197-205.

De Backer, M. D., Ilyina, T., Ma, X. J., Vandoninck, S., Luyten, W. H. and Vanden Bossche, H. (2001). Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray. *Antimicrob Agents Chemother* 45(6): 1660-1670.

De Moraes Borba, C. and Schaffer, G. M. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and an attempt to induce the dimorphic process with fetal calf serum. *Mycoses* 45(5-6): 174-179.

Del Negro, G. (1982). Ketoconazole in paracoccidioidomycosis. A long-term therapy study with prolonged follow-up. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 24(1): 27-39.

Delom, F., Szponarski, W., Sommerer, N., Boyer, J. C., Bruneau, J. M., Rossignol, M. and Gibrat, R. (2006). The plasma membrane proteome of *Saccharomyces cerevisiae* and its response to the antifungal calcofluor. *Proteomics* 6(10): 3029-3039.

Diao, Y., Zhao, R., Deng, X., Leng, W., Peng, J. and Jin, Q. (2009). Transcriptional profiles of *Trichophyton rubrum* in response to itraconazole. *Med Mycol* 47(3): 237-247.

Dillon, N. L., Sampaio, S. A., Habermann, M. C., Marques, S. A., Lastoria, J. C., Stolf, H. O., Silva, N. C. and Curi, P. R. (1986). Delayed results of treatment of paracoccidioidomycosis with amphotericin B plus sulfamides versus amphotericin B alone. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 28(4): 263-266.

Dupont, B. (2002). Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *J Antimicrob Chemother* 49 Suppl 1: 31-36.

Duy, N. V., Mader, U., Tran, N. P., Cavin, J. F., Tam le, T., Albrecht, D., Hecker, M. and Antelmann, H. (2007). The proteome and transcriptome analysis of *Bacillus subtilis* in response to salicylic acid. *Proteomics* 7(5): 698-710.

Felipe, M. S., Andrade, R. V., Arraes, F. B., Nicola, A. M., Maranhao, A. Q., Torres, F. A., Silva-Pereira, I., Pocas-Fonseca, M. J., Campos, E. G., Moraes, L. M., Andrade, P. A., Tavares, A. H., Silva, S. S., Kyaw, C. M., Souza, D. P., Pereira, M., Jesuino, R. S., Andrade, E. V., Parente, J. A., Oliveira, G. S., Barbosa, M. S., Martins, N. F., Fachin, A. L., Cardoso, R. S., Passos, G. A., Almeida, N. F., Walter, M. E., Soares, C. M. A., Carvalho, M. J. and Brigido, M. M. (2005). Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem* 280(26): 24706-24714.

Ferreira, M. E., Marques Edos, R., Malavazi, I., Torres, I., Restrepo, A., Nunes, L. R., de Oliveira, R. C., Goldman, M. H. and Goldman, G. H. (2006). Transcriptome analysis and molecular studies on sulfur metabolism in the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mol Genet Genomics* 276(5): 450-463.

Florio, A. R., Ferrari, S., De Carolis, E., Torelli, R., Fadda, G., Sanguinetti, M., Sanglard, D. and Posteraro, B. (2011). Genome-wide expression profiling of the response to short-term exposure to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* serotype A. *BMC Microbiol* 11: 97.

Franco, M., Peracoli, M. T., Soares, A., Montenegro, R., Mendes, R. P. and Meira, D. A. (1993). Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol* 5: 115-149.

Furtado, J. S., de Brito, T. and Freymuller, E. (1967). The structure and reproduction of *Paracoccidioides brasiliensis* in human tissue. *Sabouraudia* 5(3): 226-229.

Gamberi, T., Cavalieri, D., Magherini, F., Mangoni, M. L., De Filippo, C., Borro, M., Gentile, G., Simmaco, M. and Modesti, A. (2007). An integrated analysis of the effects of Esculentin 1-21 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1774(6): 688-700.

Garcia, A. M., Hernandez, O., Aristizabal, B. H., De Souza Bernardes, L. A., Puccia, R., Naranjo, T. W., Goldman, G. H., Goldman, M. H., Cano, L. E., Restrepo, A. and McEwen, J. G. (2009). Gene expression analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* transition from conidium to yeast cell. *Med Mycol*: 1-9.

Gautam, P., Shankar, J., Madan, T., Sirdeshmukh, R., Sundaram, C. S., Gade, W. N., Basir, S. F. and Sarma, P. U. (2008). Proteomic and transcriptomic analysis of *Aspergillus fumigatus* on exposure to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 52(12): 4220-4227.

Ghannoum, M. A. and Rice, L. B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 12(4): 501-517.

Gonzalez, A., Gomez, B. L., Diez, S., Hernandez, O., Restrepo, A., Hamilton, A. J. and Cano, L. E. (2005). Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. *Infect Immun* 73(4): 2486-2495.

Goodman, A. (1996). *As bases farmacológicas da terapêutica*. Cidade do México, McGraw Hill.

Grau, S. and Mateu-De Antonio, J. (2003). Comment: caspofungin acetate for treatment of invasive fungal infections. *Ann Pharmacother* 37(12): 1919.

Grose, E. and Tamsitt, J. R. (1965). *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. *Sabouraudia* 4(2): 124-125.

Hamilton, A. J. and Gomez, B. L. (2002). Melanins in fungal pathogens. *J Med Microbiol* 51(3): 189-191.

Hoehamer, C. F., Cummings, E. D., Hilliard, G. M. and Rogers, P. D. (2010). Changes in the proteome of *Candida albicans* in response to azole, polyene, and echinocandin antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 54(5): 1655-1664.

Hooshdaran, M. Z., Hilliard, G. M. and Rogers, P. D. (2005). Application of proteomic analysis to the study of azole antifungal resistance in *Candida albicans*. *Methods Mol Med* 118: 57-70.

Johnson, W. D. and Lang, C. M. (1977). Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) in a *squirrel monkey* (*Saimiri sciureus*). *Vet Pathol* 14(4): 368-371.

Kelly, S. L., Arnoldi, A. and Kelly, D. E. (1993). Molecular genetic analysis of azole antifungal mode of action. *Biochem Soc Trans* 21(4): 1034-1038.

Kley, N. (2004). Chemical dimerizers and three-hybrid systems: scanning the proteome for targets of organic small molecules. *Chem Biol* 11(5): 599-608.

Komatsu, T., Salih, E., Helmerhorst, E. J., Offner, G. D. and Oppenheim, F. G. (2011). Influence of histatin 5 on *Candida albicans* mitochondrial protein expression assessed by quantitative mass spectrometry. *J Proteome Res* 10(2): 646-655.

Krcmery, V. C., Jr. (2005). Antifungal chemotherapeutics. *Med Princ Pract* 14(3): 125-135.

Kurokawa, C. S., Sugizaki, M. F. and Peracoli, M. T. (1998). Virulence factors in fungi of systemic mycoses. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 40(3): 125-135.

Lee, R. E., Liu, T. T., Barker, K. S., Lee, R. E. and Rogers, P. D. (2005). Genome-wide expression profiling of the response to ciclopirox olamine in *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 55(5): 655-662.

Lindsey, M. E., Meyer, T. M. and Thurman, E. M. (2001). Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 73(19): 4640-4646.

Liu, S., Sun, Y., Li, W., Yu, H., Li, X., Liu, Z., Zeng, J., Zhou, Y., Chen, C. and Jia, J. (2010). The antibacterial mode of action of allitridi for its potential use as a therapeutic agent against *Helicobacter pylori* infection. *FEMS Microbiol Lett* 303(2): 183-189.

Liu, T. T., Lee, R. E., Barker, K. S., Wei, L., Homayouni, R. and Rogers, P. D. (2005). Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 49(6): 2226-2236.

Lopez, A., Parsons, A. B., Nislow, C., Giaever, G. and Boone, C. (2008). Chemical-genetic approaches for exploring the mode of action of natural products. *Prog Drug Res* 66: 237, 239-271.

Maertens, J. A. (2004). History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect* 10 Suppl 1: 1-10.

Marques, E. R., Ferreira, M. E., Drummond, R. D., Felix, J. M., Menossi, M., Savoldi, M., Travassos, L. R., Puccia, R., Batista, W. L., Carvalho, K. C., Goldman, M. H. and Goldman, G. H. (2004). Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression

subtraction hybridization and differential macroarray analysis. *Mol Genet Genomics* 271(6): 667-677.

Martinez, R. (2010). Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 43(4): 480.

Matute, D. R., McEwen, J. G., Puccia, R., Montes, B. A., San-Blas, G., Bagagli, E., Rauscher, J. T., Restrepo, A., Morais, F., Nino-Vega, G. and Taylor, J. W. (2006). Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* 23(1): 65-73.

McEwen, J. G., Bedoya, V., Patino, M. M., Salazar, M. E. and Restrepo, A. (1987). Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol* 25(3): 165-175.

Mendes-Giannini, M. J., Hanna, S. A., da Silva, J. L., Andreotti, P. F., Vincenzi, L. R., Benard, G., Lenzi, H. L. and Soares, C. P. (2004). Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. *Microbes Infect* 6(10): 882-891.

Mendes, R. P., Negroni, R. and Arechavala, A. (1994). Treatment and control of cure. Paracoccidioidomycosis. M. Franco, C. S. Lacaz, Restrepo-Moreno and G. Del Negro, Boca Raton: CRC Press: 373-392.

Morejon, K. M., Machado, A. A. and Martinez, R. (2009). Paracoccidioidomycosis in patients infected with and not infected with human immunodeficiency virus: a case-control study. *Am J Trop Med Hyg* 80(3): 359-366.

Nakai, T., Uno, J., Ikeda, F., Tawara, S., Nishimura, K. and Miyaji, M. (2003). In vitro antifungal activity of Micafungin (FK463) against dimorphic fungi: comparison of yeast-like and mycelial forms. *Antimicrob Agents Chemother* 47(4): 1376-1381.

Nemecek, J. C., Wuthrich, M. and Klein, B. S. (2006). Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science* 312(5773): 583-588.

Paniago, A. M., de Freitas, A. C., Aguiar, E. S., Aguiar, J. I., da Cunha, R. V., Castro, A. R. and Wanke, B. (2005). Paracoccidioidomycosis in patients with human immunodeficiency virus: review of 12 cases observed in an endemic region in Brazil. *J Infect* 51(3): 248-252.

Patel, O. G., Mberu, E. K., Nzila, A. M. and Macreadie, I. G. (2004). Sulfa drugs strike more than once. *Trends Parasitol* 20(1): 1-3.

Peres da Silva, R., Matsumoto, M. T., Braz, J. D., Voltan, A. R., de Oliveira, H. C., Soares, C. P. and Mendes Giannini, M. J. (2011). Differential gene expression analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* during keratinocyte infection. *J Med Microbiol* 60(Pt 3): 269-280.

Petri, W. A. (2001). Antimicrobial agents: sulfonamides, trimethoprim, sulfamethoxazole, quinolones and agents in urinary tract agents. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. J. C. L. Hardman, L. E.; Gilman, A. G. 36: 1122-1131.

Pinzan, C. F., Ruas, L. P., Casabona-Fortunato, A. S., Carvalho, F. C. and Roque-Barreira, M. C. (2010). Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PLoS One* 5(5): e10757.

Pontes, H. A., Guimaraes, D. M., Pontes, F. S., Paiva, H. B., Pinto, L. C., de Freitas Silva, B. S. and Dos Santos Pinto, D., Jr. (2011). Kaposi sarcoma and paracoccidioidomycosis in the same fragment of oral mucosa biopsy: a rare association in human immunodeficiency virus-positive patient. A case report. *Diagn Microbiol Infect Dis* 69(2): 196-199.

Prado, M., da Silva, M. B., Laurenti, R., Travassos, L. R. and Taborda, C. P. (2009). Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(3): 513-521.

Queiroz-Telles, F. (1994). *Paracoccidioides brasiliensis* ultrastructural Findings. Paracoccidioidomycosis. M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno and G. Del Negro. London, CRC Press: 27-44.

Ratledge, C. and Dover, L. G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 54: 881-941.

Reinoso, C., Nino-Vega, G., San-Blast, G. and Dominguez, A. (2005). Random sequencing of *Paracoccidioides brasiliensis* genes. *Med Mycol* 43(8): 681-689.

Restrepo-Moreno, A. (2003). Paracoccidioidomycosis. *Clinical Mycology*. W. E. Dismukes, P. G. Pappas and J. Sobel. New York, Oxford University Press: 328-345.

Restrepo, A. (1985). The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia* 23(5): 323-334.

Restrepo, A., McEwen, J. G. and Castaneda, E. (2001). The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol* 39(3): 233-241.

Restrepo, A., Salazar, M. E., Cano, L. E., Stover, E. P., Feldman, D. and Stevens, D. A. (1984). Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 46(2): 346-353.

Restrepo, A. and Tabares Cde, B. (1984). In vitro susceptibility of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form to antifungal agents. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 26(6): 322-328.

Ribeiro, A. M., Bocca, A. L., Amaral, A. C., Souza, A. C., Faccioli, L. H., Coelho-Castelo, A. A., Figueiredo, F., Silva, C. L. and Felipe, M. S. (2010). HSP65 DNA as therapeutic strategy to treat experimental paracoccidioidomycosis. *Vaccine* 28(6): 1528-1534.

Ribeiro, L. C., Hahn, R. C., Favalessa, O. C., Tadano, T. and Fontes, C. J. (2009). [Systemic mycosis: factors associated with death among patients infected with the human immunodeficiency virus, Cuiaba, State of Mato Grosso, Brazil, 2005-2008]. *Rev Soc Bras Med Trop* 42(6): 698-705.

Richini-Pereira, V. B., Bosco Sde, M., Griese, J., Theodoro, R. C., Macoris, S. A., da Silva, R. J., Barrozo, L., Tavares, P. M., Zancope-Oliveira, R. M. and Bagagli, E. (2008). Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol* 46(1): 35-40.

Rivitti, E. A. and Aoki, V. (1999). Deep fungal infections in tropical countries. *Clin Dermatol* 17(2): 171-190; discussion 105-176.

Rogers, P. D., Vermitsky, J. P., Edlind, T. D. and Hilliard, G. M. (2006). Proteomic analysis of experimentally induced azole resistance in *Candida glabrata*. *J Antimicrob Chemother* 58(2): 434-438.

San-Blas, G. and Niño-Vega, G. (2008). *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. *Mycopathologia* 165(4-5): 183-195.

San-Blas, G., Nino-Vega, G. and Iturriaga, T. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* 40(3): 225-242.

Sanglard, D. (2002). Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr Opin Microbiol* 5(4): 379-385.

Shikanai-Yasuda, M. A., Telles Filho Fde, Q., Mendes, R. P., Colombo, A. L. and Moretti, M. L. (2006). [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. *Rev Soc Bras Med Trop* 39(3): 297-310.

Sigle, H. C., Thewes, S., Niewerth, M., Korting, H. C., Schafer-Korting, M. and Hube, B. (2005). Oxygen accessibility and iron levels are critical factors for the antifungal action of ciclopirox against *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 55(5): 663-673.

Silva-Vergara, M. L., Teixeira, A. C., Curi, V. G., Costa Junior, J. C., Vanunce, R., Carmo, W. M. and Silva, M. R. (2003). Paracoccidioidomycosis associated with human immunodeficiency virus infection. Report of 10 cases. *Med Mycol* 41(3): 259-263.

Silva, A. P., Miranda, I. M., Guida, A., Synnott, J., Rocha, R., Silva, R., Amorim, A., Pina-Vaz, C., Butler, G. and Rodrigues, A. G. (2011). Transcriptional profiling of azole-resistant *Candida parapsilosis* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 55(7): 3546-3556.

Stevens, D. A. and Vo, P. T. (1982). Synergistic interaction of trimethoprim and sulfamethoxazole on *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 21(5): 852-854.

Strom, K., Schnurer, J. and Melin, P. (2005). Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression. *FEMS Microbiol Lett* 246(1): 119-124.

Taborda, C. P., da Silva, M. B., Nosanchuk, J. D. and Travassos, L. R. (2008). Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia* 165(4-5): 331-339.

Tavares, A. H., Silva, S. S., Dantas, A., Campos, E. G., Andrade, R. V., Maranhao, A. Q., Brigido, M. M., Passos-Silva, D. G., Fachin, A. L., Teixeira, S. M., Passos, G. A., Soares, C. M. A., Bocca, A. L., Carvalho, M. J., Silva-Pereira, I. and Felipe, M. S. (2007). Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbes Infect* 9(5): 583-590.

Teixeira, M. M., Theodoro, R. C., de Carvalho, M. J., Fernandes, L., Paes, H. C., Hahn, R. C., Mendoza, L., Bagagli, E., San-Blas, G. and Felipe, M. S. (2009).

Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol* 52(2): 273-283.

Terrell, C. L. (1999). Antifungal agents. Part II. The azoles. *Mayo Clin Proc* 74(1): 78-100.

Travassos, L. R., Taborda, C. P. and Colombo, A. L. (2008). Treatment options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. *Expert Rev Anti Infect Ther* 6(2): 251-262.

Valera, E. T., Mori, B. M., Engel, E. E., Costa, I. S., Brandao, D. F., Nogueira-Barbosa, M. H., Queiroz, R. G., Silveira, V. D., Scrideli, C. A. and Tone, L. G. (2008). Fungal infection by *Paracoccidioides brasiliensis* mimicking bone tumor. *Pediatr Blood Cancer*.

Villar, L. A., Salazar, M. E. and Restrepo, A. (1988). Morphological study of a variant of *Paracoccidioides brasiliensis* that exists in the yeast form at room temperature. *J Med Vet Mycol* 26(5): 269-276.

Viscoli, C., Girmenia, C., Marinus, A., Collette, L., Martino, P., Vandercam, B., Doyen, C., Lebeau, B., Spence, D., Krcmery, V., De Pauw, B. and Meunier, F. (1999). Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Clin Infect Dis* 28(5): 1071-1079.

Waldorf, A. R. and Polak, A. (1983). Mechanisms of action of 5-fluorocytosine. *Antimicrob Agents Chemother* 23(1): 79-85.

Wang, D., Yu, L., Xiang, H., Fan, J., He, L., Guo, N., Feng, H. and Deng, X. (2008). Global transcriptional profiles of *Staphylococcus aureus* treated with berberine chloride. *FEMS Microbiol Lett* 279(2): 217-225.

Woyke, T., Berens, M. E., Hoelzinger, D. B., Pettit, G. R., Winkelmann, G. and Pettit, R. K. (2004). Differential gene expression in auristatin PHE-treated *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 48(2): 561-567.

Xu, Y., Wang, Y., Yan, L., Liang, R. M., Dai, B. D., Tang, R. J., Gao, P. H. and Jiang, Y. Y. (2009). Proteomic analysis reveals a synergistic mechanism of fluconazole and berberine against fluconazole-resistant *Candida albicans*: endogenous ROS augmentation. *J Proteome Res* 8(11): 5296-5304.

Yang, S., Cha, J. and Carlson, K. (2005). Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater

by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1097(1-2): 40-53.

Yasuda, M. A. (2005). Pharmacological management of paracoccidioidomycosis. *Expert Opin Pharmacother* 6(3): 385-397.

Yu, L., Zhang, W., Liu, T., Wang, X., Peng, J., Li, S. and Jin, Q. (2007). Global gene expression of *Trichophyton rubrum* in response to PH11B, a novel fatty acid synthase inhibitor. *J Appl Microbiol* 103(6): 2346-2352.

Zeng, Y. B., Qian, Y. S., Ma, L. and Gu, H. N. (2007). Genome-wide expression profiling of the response to terbinafine in *Candida albicans* using a cDNA microarray analysis. *Chin Med J (Engl)* 120(9): 807-813.

Zhang, L., Zhang, Y., Zhou, Y., An, S. and Cheng, J. (2002a). Response of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* to amphotericin B and nystatin measured by microarrays. *J Antimicrob Chemother* 49(6): 905-915.

Zhang, L., Zhang, Y., Zhou, Y., Zhao, Y. and Cheng, J. (2002b). Expression profiling of the response of *Saccharomyces cerevisiae* to 5-fluorocytosine using a DNA microarray. *Int J Antimicrob Agents* 20(6): 444-450.

Zhao, R., Bin, W., Diao, Y., Yang, J., Liu, T., Peng, J. and Jin, Q. (2009). Global transcriptional profiles of *Trichophyton rubrum* in response to Flucytosine. *Sci China C Life Sci* 52(12): 1173-1185.