

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

**Estratégias na identificação e caracterização de
potenciais antifúngicos e seus alvos em
*Paracoccidioides brasiliensis***

TESE DE DOUTORADO
TESE DE DOUTORADO

CANDIDATA: PATRÍCIA FERNANDA ZAMBUZZI CARVALHO
ORIENTADORA: DRA. MARISTELA PEREIRA

GOIÂNIA - 2010

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

Patrícia Fernanda Zambuzzi Carvalho

Estratégias na identificação e caracterização de potenciais antifúngicos e seus
alvos em *Paracoccidioides brasiliensis*

**Goiânia
2010**



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, 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.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a):	Patrícia Fernanda Zambuzzi Carvalho				
CPF:		E-mail:	patricia.zambuzzi@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?		<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não		
Vínculo Empregatício do autor	Sem vínculo empregatício				
Agência de fomento:	CAPES			Sigla:	
País:	Brasil	UF:	GO	CNPJ:	
Título:	Estratégias na identificação e caracterização de potenciais antifúngicos e seus alvos em <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>				
Palavras-chave:	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , antifúngicos, <i>Eugenia uniflora</i> , alvos para droga.				
Título em outra língua:	Strategies for identification and characterization of potential antifungal agents and their targets in <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>				
Palavras-chave em outra língua:	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , antifungal, <i>Eugenia uniflora</i> , targets for drug.				
Área de concentração:	Microbiologia				
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	10/09/2010				
Programa de Pós-Graduação:	Medicina Tropical e Saúde Pública				
Orientador(a): Profa. Dra. Maristela Pereira	E-mail: mani@icb.ufg.br				

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

Capítulos. Especifique: _____

Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Assinatura do(a) autor(a)

Data: ____ / ____ / ____

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.



UFG

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

Patrícia Fernanda Zambuzzi Carvalho

Estratégias na identificação e caracterização de potenciais antifúngicos e seus alvos em *Paracoccidioides brasiliensis*

Orientadora: Maristela Pereira

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Apoio Financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), International Foundation for Sciences (IFS) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

**Goiânia
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG**

C331e Carvalho, Patrícia Fernanda Zambuzzi.
Estratégias na identificação e caracterização de potenciais antifúngicos e seus alvos em *Paracoccidioides brasiliensis* [manuscrito] / Patrícia Fernanda Zambuzzi Carvalho. - 2010.
144 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maristela Pereira.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2010.
Bibliografia.

1. Fungo - *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Micose - *Paracoccidioidomicose*. I.Título

CDU: 582.28

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maristela Pereira – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dr. Charley Christian Staats – Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Profa. Dra. Suzana da Costa Santos – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. André Kipnis – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás

SUPLENTE

Profa. Dra. Silvia Maria Salem-Izaac - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Profa. Dra. Luciane Madureira de Almeida - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Profa. Dra. Fabiana Fonseca Zanoelo - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Profa. Dra. Juliana Alves Parente - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

*Honra o médico por causa da necessidade,
Pois foi o altíssimo quem o criou.
Toda a medicina provém de Deus,
E ele recebe presentes do rei:
A ciência do médico o eleva em honra;
Ele é admirado na presença dos grandes.
O Senhor faz a terra produzir os medicamentos:
O homem sensato não os despreza.
Uma espécie de madeira não adoçou o amargor da água?
Essa virtude chegou ao conhecimento dos homens
O Altíssimo deu-lhes a ciência da medicina
Para ser honrado em suas maravilhas;
E dela se serve para acalmar as dores e curá-las;
O farmacêutico faz misturas agradáveis,
compõem unguentos uteis à saúde,
e seu trabalho não terminará,
até que a paz divina se estenda sobre a face da terra.*

Eclo 38, 1-8.

*As novas opiniões são sempre suspeitas
e geralmente opostas, por nenhum outro motivo
além do fato de ainda não serem comuns.*

John Locke

*Ao meu esposo, Emerson, que sempre
está ao meu lado me apoiando e incentivando,
obrigada pelo amor, carinho e dedicação.*

*Aos meus filhos, Pedro Antônio e Enzo Rafael,
razões da minha vida, felicidade infinita,
amor desmedido.....*

*Aos meus pais, Sônia e Dirceu, que sempre
estiveram ao meu lado, me amparando
e me guiando.*

*À minha orientadora, Maristela, exemplo
de competência e dedicação.
Obrigada pelo apoio, confiança e oportunidade.
Admiro muito você.*

Agradecimentos

Primeiramente à Deus, que me presenteia todos os dias com uma nova oportunidade. Por toda força, coragem e determinação durante toda minha trajetória. Obrigada Senhor por suas bênçãos derramadas, seu amor e carinho.

À Profa Dra Suzana Santos e ao Prof Pedro Henrique Ferri, do Instituto de Química, por me deixarem sempre à vontade quando precisei de mais um "pouquinho" da amostra de oenoteína B para repetir um experimento. Obrigada por todo o carinho e atenção que sempre me receberam.

À Profa Dra Célia Maria de Almeida Soares, pessoa a quem admiro muito por sua competência e liderança. Obrigada pelas sugestões discutidas durante o trabalho.

À Profa Silvia Maria Salem-Isacc e ao Prof Dr. Alexandre Melo Bailão pelas sugestões feitas em minha qualificação e também por estarem sempre à disposição nos momentos de discutir algum resultado ou tentar solucionar algum problema.

Às amigas e companheiras, Kelly, Daciene e Sara. Obrigada pelo convívio agradável durante as discussões de trabalho e seminário. As conversas com vocês sempre foram muito importantes, todo apoio, carinho e amizade de vocês foram fundamentais para a realização de mais essa etapa.

Amanda, Mariana e Ronney, vocês tornaram meus dias, muitas vezes, mais felizes durante todo o trabalho realizado no LBM.

Ao Benedito Neto e Renata Villar, meus queridos amigos, sempre alegres e sorridentes, vocês souberam fazer meus dias de trabalho no LBM bem mais felizes.

À Raquel e Martha, queridas companheiras de bancada. Obrigada, pela força e companhia, (muito agradáveis, por sinal) quando eu ficava até "altas" horas no LBM para terminar algum experimento. Vocês me auxiliaram muito durante quase todo o meu trabalho.

À Patrícia Kott, muito obrigada pelos suportes que me foram dados por você durante os meses que precisei me ausentar do LBM. Obrigada pela força nos últimos detalhes de preparação da tese. Tenho muito carinho por você.

Aos amigos e companheiros que já se foram do LBM, deixando muita saudade, mas saíram para trilharem seus caminhos: Maria Regilda, Rogério Troian, Lidiane Santana, Sabrina, Sarah, Wesley, Rodrigo, Aline, Kesser, Nathalie. Que vocês alcancem seus objetivos.

Aos queridos Leandro, Dayane e Cristina, vocês são pessoas muito especiais. Obrigada, pelo bom convívio e carinho. Cristina, obrigado pelas conversas, sempre agradáveis e por sua disposição, em ajudar sempre.

Ao Clayton e à Juliana, mutio obrigada pela atenção de vocês. Sempre que eu precisei vocês estavam à disposição para ajudar. Jú, muito obrigada por ter me ajudado no início à realizar o sequenciamento de meus clones. Clayton, obrigada por todo o suporte que me deu.

Aos companheiros do Laboratório de Biologia Molecular: Symone Vitoriano, Karine, Joice, Nayshe, Nádia, Felipe, Priscila, Patrícia Lima, Elisa Flávia, Mirelle, Helen, Ana Flávia, Keila, Marco Túlio, Elvis, Ademar, Simone Weber, Sheyla, pela ajuda, pelo companheirismo e pelo sorriso sempre oferecidos.

Ao Zezinho e Kariny, que sempre me recebem muito bem no IPTSP, e me ajudaram sempre que necessário. Meu eterno agradecimento.

Aos meninos da Única, que me aguentaram por perto durante toda a escrita da miha tese.

A Valdelícia, minha secretária do lar, que me ajudou muito com os trabalhos domésticos. Muito obrigada.

Às meninas da limpeza, que todos os dias deixavam o LBM sempre limpo para que nós pudéssemos ter mais um dia de trabalho.

À todos que de alguma forma, me incentivaram, me ergueram ou me apoiaram durante a realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Sumário

Sumário	xvi
Lista de Abreviaturas	xviii
Resumo	xxi
Abstract	xxii

Capítulo I – Considerações Gerais

1. Introdução	23
1.1 Aspectos Gerais do fungo <i>P. brasiliensis</i>	23
1.2 Dimorfismo do fungo <i>P. brasiliensis</i>	26
1.3 Transcriptomas do fungo <i>P. brasiliensis</i>	27
2. PCM	30
2.1 Abordagens terapêuticas de antifúngicos e tratamento da PCM	32
3. Plantas utilizadas com fins terapêuticos	36
3.1 <i>E. uniflora</i> e Oenoteína B	37
3.2 RDA	40
4. Caracterização de alvos para agentes antifúngicos	44
4.1 Ciclo do glioxalato	44
4.2 Via de degradação da alantoína	47
4.3 A enzima MLS	48
JUSTIFICATIVAS	52
OBJETIVOS	54

Capítulo II

Manuscrito 1: Transcriptional profile of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> induced by oenothlein B, a potential antifungal agent from the Brazilian Savannah plant <i>Eugenia uniflora</i>	55
---	----

Capítulo III

Manuscrito 2: The malate synthase of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb01 is required in the glyoxylate cycle and in the allantoin degradation pathway	106
CONCLUSÕES	118
PERSPECTIVAS	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
Colaborações científicas durante o doutorado	146
ANEXOS	147

Lista de abreviaturas

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida

cAMP: adenosina 3',5'- monofosfato cíclico

CIM: concentração inibitória mínima

crt3: transportador de cobre de alta afinidade

CDII: cisteína dioxigenase

CDB: convenção sobre diversidade biológica

cDNA: DNA complementar

CIT1: citrato sintetase

CYP51: citocromo P-450 14- α -esterol demetilase

CYP61: C22 esterol desaturase

DNA: ácido desoxirribonucléico

EBP: estradiol binding protein (protein de ligação ao estradiol)

ELISA: enzyme linked immuno sorbent assay (ensaio de ligação imuno absorvente)

ERG1: esqualeno epoxidase

ERG5: C22 esterol desaturase

ERG6: esterol C-metil transferase

ERG7: (2,3)-oxido esqualeno ciclase

ERG9: esqualeno sintase

ERG11: citocromo P-450 14- α -esterol demetilase

ERG25: C-4metil esterol oxidase

EST: expressed sequence tag (etiquetas de sequências expressas)

ETF-QO: transportador de elétrons flavoproteína-ubiquinona oxidoreductase

5-FC: 5-flucitosina

5-FU: 5-fluorouracil

FBPI: frutose-1,6-bifosfatase

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

gp43: glicoproteína de 43kDa

4-HPPB: 4-hidroxil-fenil piruvato dioxigenase

HSP: heat shock protein (proteína de choque térmico)

PbICL: isocitrato liase de *Paracoccidioides brasiliensis*

ICL: isocitrato liase

ITS: internally transcribed spacer (espaçador interno transcrito)

kDa: kiloDalton

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

MLSs: malato sintases

mRNA: ácido ribonucléico mensageiro

MLS: malato sintase

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NTBC: 2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoil)-ciclohexano-1,3-dionel

OLEI: Delta-9 ácido graxo desaturase

Pb01, *Pb03* e *Pb18*: isolados 01, 03 e 18 de *Paracoccidioides brasiliensis*

Pbfks1: transcrito de 1,3- -glicana sintase de *Paracoccidioides brasiliensis*

Pbmls: transcrito de malato sintase de *Paracoccidioides brasiliensis*

PbMLS: proteína malato sintase de *Paracoccidioides brasiliensis*

PCM: paracoccidioidomicose

PS: espécie filogenética

PTS1: sinal de endereçamento para os peroxissomos

PCR: reação em cadeia da polimerase

PKA: proteína quinase A

PEP: fosfoenolpiruvato carboxiquinase

qRT-PCR: PCR quantitativa acoplada à transcrição reversa

RT-PCR_{sq}: transcrição reversa semi-quantitativa – reação em cadeia da polimerase

NMR: Ressonância Magnética Nuclear

RDA: análise diferencial representacional

RNA: ácido ribonucléico

rRNA: ácido ribonucléico ribossômico

SBF: fetal bovine serum (soro fetal bovino)

SSH: Hibridização Subtrativa por Supressão

S: espécie

PbSMT: (24)-esterol metil transferase de *Paracoccidioides brasiliensis*

TAS1: tiredoxina peroxidase

TMP-SMT: sulfonamidas complementadas com trimetoprima

zrtI: transportador de zinco

Resumo

O fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica humana geograficamente distribuída na América Latina, sendo a oitava causa de morte mais comum entre as infecções crônicas recorrentes. A PCM é adquirida pela inalação de propágulos do fungo, os quais chegam ao pulmão, e é disseminado pela corrente sanguínea e/ou linfática para todas as partes do corpo. O tratamento da PCM é longo, iniciando com uma dosagem de agentes antifúngicos agressiva, se estendendo por meses ou anos. A resistência às drogas antimicrobianas pode limitar a capacidade do tratamento efetivo dos pacientes, interferindo na eficácia da terapêutica. Desta forma, torna-se necessário a descoberta e desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. Compostos de plantas são produtos biológicos, com uma grande diversidade estrutural, muitas das quais são modelos para a síntese de um vasto número de fármacos. A atuação do composto oenoteína B, purificado das folhas de *Eugenia uniflora*, uma planta do Cerrado Brasileiro, foi avaliado no crescimento, viabilidade e expressão de genes de *P. brasiliensis*. O composto interferiu com a morfologia das células e inibiu os transcritos de -1-3-glicana sintase. O efeito sinérgico entre oenoteína B e os fármacos utilizados no tratamento da PCM (anfotericina B, itraconazol, sulfametoxazol e a combinação trimetoprim-sulfametoxazol), foi avaliado no presente estudo, através do método de sensibilidade em placas. A maior inibição no crescimento das colônias do fungo foi observada na associação da oenoteína B com a combinação trimetoprim-sulfametoxazol, seguido com anfotericina B, itraconazol e sulfametoxazol, respectivamente. A Análise Diferencial Representacional (RDA) também foi realizada visando elucidar o mecanismo de ação da oenoteína B em *P. brasiliensis*. Foram identificadas 463 ESTs induzidas e 121 ESTs reprimidas, após 90 min de incubação de células leveduriformes do fungo com o composto. Após 180 min de incubação foram identificadas 301 ESTs induzidas e 143 reprimidas. As ESTs foram classificadas de acordo com suas categorias funcionais utilizando o programa Blast2GO. As análises indicaram a presença de transcritos com funções relacionados à parede e membrana celular, fatores de transcrição e proteínas hipotéticas. No presente trabalho, foi avaliado ainda, as características do cDNA, a regulação da expressão gênica de *Pbmls*, e a atividade enzimática da proteína de *P. brasiliensis* (*PbMLS*), isolado *Pb01*. O cDNA contém 1617 pb, que codifica uma proteína de 539 aminoácidos. A proteína apresenta a assinatura das MLSs, resíduos catalíticos essenciais para a atividade e o sinal de endereçamento para os peroxissomos, PTS1. O maior nível do transcrito *Pbmls* observado na presença de fontes de 2C sugere que em *P. brasiliensis*, a regulação primária do fluxo de carbono no ciclo do glioxalato foi ao nível dos transcritos de *Pbmls*. As análises de transcritos, níveis de proteínas e atividades enzimáticas na presença de diferentes fontes de carbono e nitrogênio sugerem que *PbMLS* esteja atuando em ambas as vias: no ciclo do glioxalato, quando fontes de 2C são utilizadas, e na via da degradação da alantoína, quando prolina é utilizada como fonte de nitrogênio, ou quando oxalurato é utilizado para induzir os genes da via.

Abstract

The thermomorphous fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the etiological agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic human mycosis geographically distributed in Latin America, being the eighth most common cause of death among chronic infections. PCM is acquired by inhalation of fungal propagules, which reach the lungs and is disseminated through the bloodstream and/or lymph to all parts of the body. The treatment of PCM is long, starting with a dosage of aggressive antifungal agents, extending for months or years. Resistance to antimicrobial drugs may limit the ability of effective treatment of patients, interfering with therapeutic efficacy. Thus, it is necessary to discover and develop new antifungal agents. Plant compounds have a great structural diversity, many of which are models for the synthesis of a vast number of drugs. The action of the oenothin B compound, purified from leaves of *Eugenia uniflora*, a plant from the Brazilian Savannah, was evaluated on growth, viability and expression of *P. brasiliensis* genes. The compound interfered with cell morphology and inhibited the transcripts of β -1,3-glucan synthase. The synergistic effect between oenothin B and drugs used to treat PCM (amphotericin B, itraconazole, Sulfamethoxazole and Trimethoprim-Sulfamethoxazole Combination) was evaluated in this study by the method of sensitivity on plates. The highest inhibition of the fungal growth was observed in association of oenothin B with Trimethoprim-Sulfamethoxazole Combination, followed by amphotericin B, itraconazole and sulfamethoxazole, respectively. Representational Difference Analysis (RDA) was also performed to elucidate the mechanism of action of oenothin B in *P. brasiliensis*. We identified 463 ESTs up regulated and 121 ESTs down regulated after 90 min of incubation of *P. brasiliensis* yeast cells with the compound. After 180 min incubation 301 ESTs up regulated and 143 down regulated were identified. The ESTs were classified according to their functional categories using the program Blast2GO. The analysis indicated the presence of transcripts with functions related to cell wall and membrane, transcription factors and hypothetical proteins. In this study, we evaluated also the characteristics of the malate synthase (*Pbmls*) cDNA, regulation of *Pbmls* gene expression, and enzymatic activity of the MLS protein of *P. brasiliensis* (*PbMLS*), isolate *Pb01*. The cDNA contains 1617 bp, which encodes a protein of 539 amino acids. The protein has the signature of the MLSs, residues essential for catalytic activity and addressing signal for peroxisomes, PTS1. The high level of *Pbmls* transcript observed in the presence of 2C sources suggests that in *P. brasiliensis*, the primary regulation of carbon flux into glyoxylate cycle was at the level of the *Pbmls* transcript. Transcript analysis, protein levels and enzymatic activity in the presence of different carbon and nitrogen sources suggest that *PbMLS* acts in both pathways: in glyoxylate cycle, when 2C sources are used, and in allantoin degradation pathway, when proline is used as nitrogen source, or when oxalurate is used to induce genes from pathway.



CAPÍTULO I

Considerações Gerais
Justificativas
objetivos

1. Introdução

1.1. Aspectos gerais do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, inicialmente descrito por Adolfo Lutz em 1908 (Lutz, 1908), é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica humana geograficamente distribuída na América Latina (Franco 1987). *P. brasiliensis* é um fungo termodimórfico, capaz de crescer na forma leveduriforme nos tecidos do hospedeiro ou quando cultivado à 37°C, e na forma miceliana em condições saprófitas ou quando cultivado à temperatura ambiente (18-23°C) (Bagagli et al. 2006; Restrepo 1985). Sua forma leveduriforme (Figura 1A) apresenta-se por brotamentos múltiplos evaginados da célula-mãe; neste caso, a célula central é circundada por várias células periféricas. A forma miceliana (Figura 1B) é caracterizada por filamentos septados com conídios terminais ou intercalares (Restrepo-Moreno 2003; Queiroz-Telles 1994).

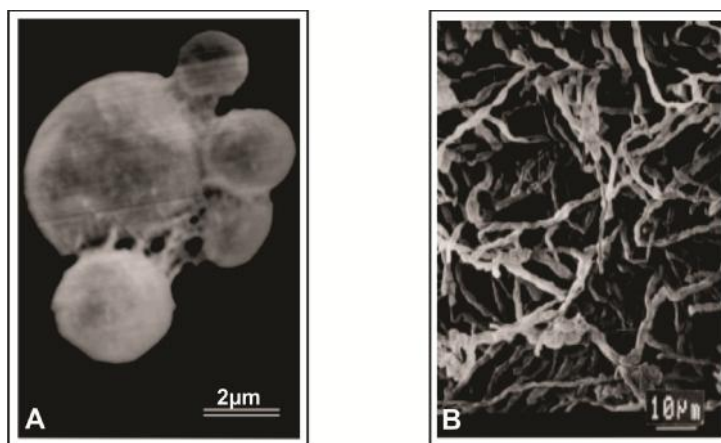


Figura 1: (A) Forma leveduriforme do fungo *P. brasiliensis* (Fonte: Santos et al. 2007). (B) Forma miceliana do fungo *P. brasiliensis* (Fonte: Silva et al. 1999).

O fato de nenhuma estrutura sexual ter sido descrita para *P. brasiliensis* dificulta sua classificação (San-Blas et al. 2002). Através de comparações filogenéticas entre fungos dermatófitos e fungos dimórficos, baseada na subunidade rRNA 28S ribossomal, Leclerc et al. (1994) classificaram *P. brasiliensis* na ordem Onygenales, família Onygenaceae (filo Ascomycota), juntamente com *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* e *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*. Atualmente o fungo *P. brasiliensis* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, subdivisão Euascomycotina, classe Plectomyceto, subclasse Euascomycetidae, ordem Onygenales, família Onygenaceae, subfamília Onygenaceae

Anamórficos, gênero *Paracoccidioides*, espécie *Paracoccidioides brasiliensis* (San-Blas et al. 2002).

Até o presente momento o fungo *P. brasiliensis* é composto por quatro espécies filogenéticas. Matute et al. (2006) propuseram três espécies filogenéticas distintas para *P. brasiliensis*: S1 (um grupo formado por 38 isolados de origem argentina, brasileira, peruana e venezuelana e um isolado de pinguim da Antártida), PS2 (6 isolados; 5 de origem brasileira e um venezuelano) e PS3 (21 isolados de origem colombiana). Posteriormente, Carrero et al. (2008) mostraram por meio de análises das regiões codificantes e não-codificantes de vários genes, bem como a região ITS, que com exceção dos genes *FKS1* e *Catalase A*, o isolado *Pb01* ficou distante de todos os outros isolados de *P. brasiliensis* utilizados nesse estudo, se agrupando com a linhagem IFM 54648, um isolado atípico, obtido de um paciente do estado do Paraná, região sul do Brasil, sugerindo a possibilidade de mais do que três espécies filogenéticas de *Paracoccidioides*, onde o isolado *Pb01* seria uma nova espécie dentro do gênero (Carrero et al. 2008, Theodoro et al. 2008). A fim de confirmar a existência da quarta espécie filogenética do fungo *P. brasiliensis*, Teixeira et al. 2009, utilizando o método de reconhecimento filogenético (GCPSR) e os isolados de *P. brasiliensis*, pertencentes aos grupos S1, PS2 e PS3 identificaram que o isolado *Pb01* apresentou grande divergência morfológica quando comparado aos isolados pertencentes à esses grupos.

O isolado *Pb01*, obtido de um paciente com PCM, foi primeiramente descrito pela Dra. Maria do Rosário Rodrigues e Silva no laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG) (Silva et al. 1994). A fim de avaliar a diferença do grau de virulência entre isolados do fungo *P. brasiliensis*, Molinari-Madlum et al. (1999), realizaram um estudo baseado na habilidade de invasão de diferentes isolados do fungo nos tecidos do hospedeiro (camundongos B10 A) e analisou, também, a severidade das lesões causadas pelos isolados. Os isolados *Pb01* e 7455 apresentaram-se com uma infecção disseminada, com inflamação granulomatosa, mostrando áreas de necrose extensas e um grande número de células fúngicas viáveis, sendo classificados como altamente virulento. Porém, os isolados *PbS*, 662, Bt e 166 apresentou infecção restrita ao fígado, com granuloma compacto e poucas colônias do fungo no período pós-infecção, sendo classificados como baixa virulência.

O fungo *P. brasiliensis* possui cromossomos pequenos, com alto grau de condensação, dificultando sua visualização por microscopia óptica (Boekhout et al. 1993). Dificuldades

no isolamento e caracterização de mutantes obtidos *in vitro* com fenótipos estáveis (Hallack et al. 1982) e o desconhecimento da fase sexual do fungo, também prejudicam os estudos de citogenética e genética sexual clássicos, que estabelecem a organização e o número de cromossomos (Queiroz-Telles, 1994; San-Blas et al. 2002). O sequenciamento dos genomas estruturais dos isolados *Pb01*, *Pb03* e *Pb18* foi realizado como uma iniciativa do Broad Institute (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html). Análises desses genomas identificaram a presença de 5 cromossomos em cada isolado que tiveram seu sequenciamento realizado (Almeida et al. 2006; Montoya et al. 1997). O genoma do isolado *Pb01* possui 32,94 Mb com um total de 9.132 genes. O isolado *Pb03* apresentou um genoma de 29,06 Mb com 7.875 genes e *Pb18* um genoma de 29,95 Mb, contendo 8.741 genes.

Mesmo conhecendo várias características deste fungo, pouco se sabe sobre seu habitat natural (Lacaz et al. 1999). Este fato pode ser atribuído ao longo período de latência e a inexistência de surtos da doença, o que tem contribuído para a dificuldade de encontrar o fungo no ambiente (Bagagli et al. 2007). No continente latino, *P. brasiliensis* tem sido isolado, esporadicamente, de solos brasileiros (Silva-Vergara et al. 1998; Shome & Batista 1963), argentinos (Negroni 1966), e venezuelanos (Albornoz 1971). O fungo também foi encontrado em fezes de morcego (*Artibeus lituratus*) (Grose & Tamsitt, 1965), pinguins (*Pygoscelis adeliae*) (Gesuele 1989), comida de cachorro (Ferreira et al. 1990), em cachorros (Ricci et al. 2004; Farias et al. 2005), e em três espécies de tatus, *Dasyopus novemcinctus* (Bagagli et al. 2003), *Cabassaus centralis* (Corredor et al. 2005) e *Dasyopus septemcinctus* (Conti-Diaz 2007). A presença do fungo em amostras de solo e mamíferos selvagens foi confirmada através de Nested-PCR, baseada nas regiões ITS-5.8S-ITS2 (Richini-Pereira et al. 2008; Theodoro et al. 2005). Em adição, amplicons de DNA específicos de *P. brasiliensis* foram detectados em amostras de linfonodos mesentéricos, baço, pulmão, glândulas adrenais e rins de porco-da-india (*Cavia aperea*), no pulmão e fígado de porco-espinho (*Sphiggurus spinosus*), nos pulmões de guaxinin (*Procyon cancrivorus*), assim como em vários órgãos de outras espécies de tatus (*Dasyopus septemcinctus*), indicando que, em áreas endêmicas, a infecção pelo fungo em animais selvagens, pode ser comum (Richini-Pereira et al. 2008).

1.2. Dimorfismo do fungo *P. brasiliensis*

O dimorfismo de *P. brasiliensis* foi descrito a partir da observação de diferentes formas do fungo no hospedeiro e em culturas à temperatura ambiente (Lutz 1908). O processo de transição *in vitro* de levedura para micélio e *vice-versa* pode ser induzido pela alteração de temperatura de incubação (Negróni 1931).

A caracterização *in vitro* do processo de diferenciação do isolado Pb01 (ATCC-MYA-826), modelo de estudo em nosso laboratório, mostrou que a diferenciação de micélio para levedura ocorre em 20 dias e de levedura para micélio em 15 dias, após a alteração da temperatura de cultivo. Em ambos, ocorre um período de latência que se dá entre 48 e 72 horas, atingindo 70-80% de diferenciação no décimo dia, caracterizando o processo de dimorfismo *in vitro* de *P. brasiliensis* como sendo lento e gradual (Silva et al. 1994).

A transição micélio-levedura em *P. brasiliensis* é governada pelo aumento de temperatura que ocorre ao contato da forma miceliana ou conídios com o hospedeiro humano. Esse evento pode ser reversivelmente, reproduzido *in vitro* alterando-se a temperatura de 22°C para 36°C e *vice-versa* (Silva et al. 1994). A patogenicidade de *P. brasiliensis* parece estar intimamente ligada à transição dimórfica, uma vez que linhagens do fungo incapazes de se transformar em leveduras não apresentaram virulência (San-Blas & Niño-Vega 2001).

Os hormônios também estão envolvidos na regulação *in vivo* do processo de diferenciação celular (Stevens 1989). O hormônio 17- β -estradiol se liga com alta afinidade e estereoespecificidade a proteína do fungo EBP (Estradiol Binding Protein) (Restrepo et al. 1984; Loose et al. 1983). Felipe et al. (2005a) identificaram um gene expresso diferencialmente na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* que possivelmente codifica a proteína EBP de 60 kDa. Acredita-se que a interação do hormônio 17- β -estradiol com a EBP citoplasmática iniba a transição de micélio para levedura, explicando a baixa incidência da infecção em mulheres (Salazar et al. 1988).

Villar et al. (1988) observaram que o dimorfismo em *P. brasiliensis* pode também estar associado a fatores nutricionais. A adição de soro fetal bovino (SFB) a meio de cultura complexo ou quimicamente definido permitiu a formação de células semelhantes a leveduras, a 25°C, denominadas YRT.

As vias de sinalização que controlam a transição morfológica em *P. brasiliensis* são pouco conhecidas. Entretanto, o envolvimento do cAMP (adenosina 3', 5' monofosfato

cíclico), MAPK (proteína quinase mitógeno ativada) e Ca^{2+} /calmodulina nas vias de transdução de sinal são relatados em outros fungos dimórficos, como *Cryptococcus neoforms* e *Candida albicans* (Lengeler et al. 2000). Um aumento na concentração de cAMP foi observado em *P. brasiliensis* durante a transição de micélio para levedura, sugerindo o envolvimento da via cAMP-PKA (cAMP dependente de proteína quinase A) neste processo (Chen et al. 2007). O cAMP exógeno é capaz de inibir a transição de levedura para micélio mantendo assim, a forma patogênica do fungo (Borger-Walmsley & Walmsley, 2000).

A via de transdução de sinal Ca^{2+} /Calmodulina está envolvida em vários aspectos no desenvolvimento fúngico, incluindo formação de conídios, extensão da hifa, dimorfismo e patogenicidade. Essa via de transdução de sinal também parece desempenhar um papel na diferenciação celular de *P. brasiliensis*, uma vez que a expressão da calmodulina e da subunidade regulatória da calcineurina mostraram-se aumentadas durante a transição dimórfica do fungo (Nunes et al., 2005).

1.3. Transcriptomas do fungo *P. brasiliensis*

Projetos transcriptomas de *P. brasiliensis* têm sido desenvolvidos no sentido de mapear os genes expressos por *P. brasiliensis* em diferentes condições. O Projeto Genoma Funcional e Diferencial foi desenvolvido visando uma melhor compreensão do metabolismo de *P. brasiliensis*, isolado *Pb01*, na fase de micélio e levedura. Nos transcriptomas relativos às fases leveduriforme e miceliana foram sequenciados um total de 6.022 ESTs. Dentre os transcritos encontrados foram observados genes relacionados à virulência e potenciais alvos para drogas, como quitina deacetilase, isocitrato liase e -1,3-glicana sintase, uma vez que eles não possuem homologia em humanos. As análises do transcriptoma também revelaram alguns prováveis componentes das vias de sinalização, como Ca^{2+} /calmodulina-calcineurina, MAPKs e AMPc/proteína quinase, (Felipe et al. 2005a; Felipe et al. 2003).

Goldman et al. (2003) identificaram 4.692 genes expressos na fase leveduriforme de *P. brasiliensis*, isolado *Pb18*, após infecção em camundongo. Foram encontrados vários genes homólogos a *C. albicans* considerados fatores de virulência e envolvidos na patogenicidade. O transcrito 4-hidroxil-fenil piruvato dioxigenase (4-HPPB) se mostrou altamente expresso durante o dimorfismo de *P. brasiliensis*. Experimentos com NTBC [2-

(2-nitro-4-trifluorometilbenzoil)-ciclohexano-1,3-dionel] e derivados, inibidores específicos da atividade de 4-HPPB, mostraram que esse composto foi capaz de inibir o crescimento e a diferenciação da fase leveduriforme de *P. brasiliensis in vitro* (Nunes et al. 2005). Estudos realizados com *Aspergillus fumigatus* (Brownlee et al. 2004) e *C. albicans* (Lock et al. 1998), os quais possuem o gene 4-HPPB, mostraram que NTBC exerce um efeito inibitório no crescimento desses fungos (Nunes et al. 2005).

Marques et al. (2004) 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 *CDII* (cisteína dioxigenase), *-1,3-glucana sintase*, *CITI* (citrato sintetase) e *ERG25* apresentaram elevados níveis de expressão na fase leveduriforme de *P. brasiliensis*. Os genes codificantes para a tiredoxina peroxidase e glutamina-S-transferase, apresentaram uma expressão preferencial na fase leveduriforme de *P. brasiliensis*. Os produtos desses genes poderiam atuar como antioxidantes reduzindo os níveis de espécies reativas com oxigênio durante o crescimento da levedura.

O perfil transcricional de *P. brasiliensis* durante a diferenciação morfológica de micélio para levedura também foi avaliado por Bastos et al. (2007), que mostraram transcritos relacionados com a síntese de proteínas de membrana e de parede celular estão induzidos durante a diferenciação transitória de micélio para levedura após 22 horas, sugerindo que *P. brasiliensis* favorece o remodelamento de membrana e parede celular durante esse processo. Foram observados ainda, transcritos relacionados a prováveis fatores de virulência e ao sistema de transdução de sinal. Neste estudo, genes envolvidos na via de assimilação do enxofre, como a sulfito redutase, mostraram-se induzidos durante o processo de transição, sugerindo o envolvimento do metabolismo do enxofre no processo de diferenciação celular no fungo (Andrade et al. 2006; Ferreira et al. 2006).

Costa et al. 2007 realizaram a análise do transcriptoma de *P. brasiliensis* durante o processo infectivo a fim de identificar as alterações na expressão gênica do fungo durante esse processo. Um total de 4.934 ESTs de células leveduriformes de *P. brasiliensis*, isolado *Pb01*, provenientes de fígado de camundongo infectado foi sequenciado e anotado. Foram encontrados genes envolvidos no metabolismo aneróbico da glicose, e alguns responsáveis pelo metabolismo de lipídios. A enzima málica, requerida para o transporte de grupos acetil do citosol e provê NADPH para a síntese de lipídios, foi encontrada super-expressa, assim como a anidrase carbônica, que provê bicarbonato para a síntese de

malonil-CoA a partir da acetil-CoA carboxilase (Costa et al. 2007). Transcritos de ERG6 (esterol C-metil transferase) e ERG9 (esqualeno sintase), precursores para biossíntese do ergosterol, também se mostraram aumentados durante o processo infeccioso, assim como transcritos relativos à enzima OLEI (Delta-9 ácido graxo desaturase), responsável pela fluidez da membrana em células animais e em micro-organismos (Gargano et al. 1995). Altos níveis de transcritos da enzima isocitrato liase, foi encontrado induzido durante o processo infectivo, indicando que o ciclo do glicoxalato está atuando nessa condição.

Com o objetivo de identificar as respostas adaptativas de *P. brasiliensis* 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 e células leveduriformes do fungo incubado em sangue humano. Nas células leveduriformes provenientes de incubação em sangue, os genes *zrt1* (transportador de zinco) e *crt3* (transportador de cobre de alta afinidade) se apresentaram reprimidos. Os transcritos de glutamina sintetase se apresentaram altamente expressos nessa condição, sugerindo que o remodelamento da parede/membrana celular pode ser uma das formas pela qual *P. brasiliensis* responde à alteração da osmolaridade externa, visto que glutamina sintetase provê a glutamina necessária para formar glicosamina 6-fosfato, necessária para a obtenção de UDP-N-acetilglicosamina, açúcar que participa da síntese de quitina (Ram et al. 2004). No entanto as amostras obtidas de modelo animal identificaram uma alta frequência de transcritos codificantes para HSP30, que podem estar contribuindo para a proteção de células danificadas. A gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), uma adesina que se liga aos componentes da matriz extracelular e é capaz de mediar a aderência e internalização de *P. brasiliensis* em cultura de células *in vitro*, se apresentou induzida (Bailão et al. 2006).

Em análises do perfil transcricional em células leveduriformes de *P. brasiliensis* após incubação com plasma humano foi possível detectar a super expressão de genes relacionados à síntese de proteínas, resposta celular à mudança de osmolaridade do meio, remodelamento celular e defesa. Os transcritos codificantes para enzimas da β -oxidação também se mostraram induzidos sugerindo que o fungo, nessa condição, desvie o seu metabolismo para a degradação de lipídios (Bailão et al. 2007).

Tavares et al. (2007) estudaram a resposta transcricional de *P. brasiliensis* à internalização por macrófagos murinos e identificaram genes super-regulados, 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. Genes relacionados ao ciclo do glioxalato também se apresentaram super-regulados àquela condição, sugerindo que *P. brasiliensis* utilize essa via metabólica para obtenção de carbono durante a internalização por macrófagos, conforme descrito por Derengowski et al. (2008).

Genes expressos durante a transição de conídios para leveduras do fungo *P. brasiliensis* foram analisados por Garcia et al. (2009), que identificaram genes não observados nas bibliotecas realizadas previamente durante a transição micélio-levedura. Dentre as ESTs identificadas encontram-se uma proteína de adaptação a estresse, SKN7 e o transportador de elétrons flavoproteína-ubiquinona oxidoreductase (ETF-QO).

2. A PCM

A PCM é uma micose humana sistêmica granulomatosa, sendo inicialmente denominada hifoblastomicose pseudococcidióica (Lutz 1908). Com o crescente registro de casos no Brasil, a doença passou a ser denominada “blastomicose brasileira” e, logo a seguir, “blastomicose sul americana”, devido à observação de casos isolados em outros países da América do Sul (Almeida 1930). Em homenagem a Adolfo Lutz e aos pesquisadores Adolfo Splendore e Floriano Paulo de Almeida, responsáveis pela caracterização morfo-biológica do fungo, a doença é também conhecida como moléstia de Lutz-Splendore-Almeida (Lacaz 1949). Em 1971, em um congresso realizado em Mendellin - Colômbia, micologistas consagraram o termo paracoccidioidomicose para a designação da doença (Hamdan & Rocha 1987).

A PCM é causada pela inalação de propágulos da forma miceliana do fungo *P. brasiliensis*, os quais chegam ao pulmão, eventualmente invadem as células de defesas do hospedeiro e é disseminado pela corrente sanguínea e/ou linfática para todas as partes do corpo (Franco 1987; McEwen et al. 1987). A PCM pode afetar qualquer órgão, após disseminação, em particular, a pele, nódulos linfáticos, pulmões, membranas das mucosas oral, nasal e gastrointestinal, e também o sistema nervoso central (Ramos-e-Silva, 2004; De Almeida, 2005;). Não existem relatos de transmissão inter-humana (Brummer et al. 1993). Após a penetração no hospedeiro, o fungo se converte para a forma patogênica de levedura, sendo este processo considerado como um passo fundamental para o

estabelecimento bem sucedido da infecção (Franco 1987) e fase inicial da interação parasito-hospedeiro (Camargo & Franco 2000).

A doença é caracterizada pelo polimorfismo das lesões (De Almeida 2005; Ramos-e-Silva, 2004), formação de grânulos epiteliais com áreas de necrose central, um halo de linfomononuclear e fibrose (Camargo & Franco 2000). A PCM pode se apresentar em duas formas principais: i) aguda/subaguda e ii) crônica. Na forma aguda/subaguda também chamada de forma juvenil, a maioria dos pacientes são crianças, adolescentes ou adultos jovens com idade inferior a 25 anos (Mendes 1994), apresentando uma variação sistêmica de leve a moderada (Marques 2003), além de decréscimo na resposta imune celular, resposta inflamatória granulomatosa e disseminação fúngica (Arango & Yarzabal 1982; Franco et al. 1987). Por outro lado, a forma crônica representa mais de 90% dos casos e ocorre em adultos com idade superior a 25 anos, com comprometimento progressivo do estado geral, uni ou multifocal. No estado unifocal, somente um órgão ou sistema é afetado (Shikanai-Yasuda et al. 2006), já no estado multifocal, muitos órgãos e sistemas são afetados (Rivitti & Aoki, 1999).

Estudos realizados por Coutinho et al. (2002), demonstraram que a PCM foi a oitava causa de morte mais comum entre as infecções crônicas recorrentes e doenças parasitárias. No entanto, Prado et al. (2009), relatam que no Brasil as mortes causadas por micoses sistêmicas como a PCM atingiram um número de 3.583 entre 1996-2006, sendo a PCM responsável por 51,2% dos casos. Nos últimos anos, a PCM tem sido apontada como uma doença oportunista quando associada a pacientes com AIDS; a mortalidade entre esses pacientes tem sido considerada alta (Ribeiro et al. 2009; Paniago et al. 2005).

A PCM é uma infecção endêmica na América Latina, onde mais de 10 milhões de pessoas são infectadas e 2% dos indivíduos desenvolvem a doença (Almeida et al. 2003; McEwen et al. 1995). No entanto, estes números tornam-se mais expressivos em áreas de maior endemicidade, como é o caso do Brasil, onde a incidência anual pode alcançar 3 casos para cada 100.000 habitantes, com letalidade de 2% a 3% (Felipe et al. 2005b). Além do Brasil, Venezuela, Colômbia, Equador e Argentina apresentam grande incidência do fungo (Marques 1998; Silvestre et al. 1997). Casos esporádicos foram reportados nos Estados Unidos, Europa e Japão, em indivíduos vindos de áreas endêmicas (Rivitti & Aoki 1999; Vale et al. 1992). A distribuição desigual de incidência pode ser encontrada em um mesmo país, por exemplo, no Brasil a doença ocorre mais frequentemente nos Estados de

São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Mato Grosso (Almeida et al. 2003; Coutinho et al. 2002; Franco et al. 1989).

Dados epidemiológicos mostram que a incidência da doença até os 12 anos de idade é similar entre os dois sexos; porém nos anos subsequentes, este número aumenta progressivamente em homens (Marques 1998), sendo que 80% a 90% dos indivíduos afetados são homens entre 29 e 40 anos de idade, predominantemente trabalhadores rurais. A incidência e progressão da PCM em áreas endêmicas são muito maiores em homens do que em mulheres, numa razão de 13:1 (Restrepo et al. 2008; Ramos-e-Silva & Saraiva, 2008; Brummer et al. 1993).

2.1. Abordagens terapêuticas de antifúngicos e tratamento da PCM

A cura espontânea não é vista frequentemente na PCM, exceto em alguns casos de infecção pulmonar primária (Miyaji & Kamei 2003). Desta forma, pacientes dos quais o fungo é isolado, devem ser submetidos ao tratamento com agentes antifúngicos (Marques et al. 2008).

O tratamento da PCM é longo, iniciando com uma dosagem de agentes antifúngicos agressiva, a partir do qual se segue com um tratamento de manutenção por meses ou anos (Shikanai-Yasuda et al. 2006), incluindo, além dos medicamentos antifúngicos, uma combinação de suporte nutricional, tratamento de eventuais sequelas e a prevenção de doenças oportunistas (Ramos-e-Silva & Saraiva 2008).

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

As sulfonamidas (sulfametoxazol ou sulfadiazina), complementada depois com a adição de trimetoprima (TMP-SMT), foi introduzida há algumas décadas no tratamento da PCM. Os possíveis efeitos adversos apresentados por essa combinação de compostos ativos são reações de hipersensibilidade, anemia megaloblástica, leucopenia, intolerância gástrica, hepatopatia (Marques 1998). As sulfonamidas são medicamento de 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 2007). As sulfonamidas

atuam inibindo a síntese de ácido fólico competindo com o ácido α -aminobenzóico na reação catalisada pela di-hidropteroato sintase, que envolve a condensação de ácido α -aminobenzóico e 6-hidroximetil-dihidropterina pirofosfato para produzir di-hidropteroato. A inibição dessa reação leva à depleção de folato intracelular, o qual é essencial para o crescimento do organismo patogênico (Hong et al. 1995).

A anfotericina B foi utilizada para o tratamento da PCM pela primeira vez em 1958. Referente ao seu mecanismo de ação sabe-se que esta molécula interage com o ergosterol, um esterol da membrana celular fúngica. Esta interação interrompe a integridade osmótica da membrana celular fúngica, comprometendo sua função de barreira, o qual leva ao extravasamento de potássio, magnésio, açúcar, metabólitos, acarretando a morte do fungo (Shikanai-Yasuda et al. 2006). Esse fármaco é considerado um medicamento de escolha em casos de PCM severa ou em pacientes com hepatopatia. Os fatores limitantes para o uso dessa medicação são cardiopatia, nefropatia em pacientes com mais de 65 anos de idade, hipertermia, resfriado, perda de apetite, náuseas (Rivitti & Aoki 1999; Marques 1998). A anfotericina B é administrada somente por via intravenosa, sob condições estritamente reguladas (Shikanai-Yasuda et al. 2006), e os intervalos para administração devem ser espaçados. O uso de um agente antifúngico oral para complementar o tratamento com anfotericina B é recomendado após sua utilização, pelo fato da imunidade celular específica não ter tempo suficiente para se recuperar (Ramos-e-Silva & Saraiva 2008).

Os azoles tiveram sua introdução marcada por um avanço no tratamento das doenças fúngicas, entre elas a PCM. Esses compostos atuam na biossíntese do ergosterol, interferindo na função desse esterol como componente de membrana, alterando a permeabilidade e fluidez normal da membrana fúngica (Odds et al. 2003). Os azóis (fluconazol, itraconazol, cetoconazol, saperconazol e voriconazol) interagem com 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). Os imidazóis (cetoconazol) e triazóis (fluconazol, itraconazol) têm sido muito utilizados no tratamento da PCM (Fagunde-Pereyra et al. 2006). Eles se apresentam ativos contra culturas *in vitro* de *P. brasiliensis*; isolados resistentes a esses azoles têm sido detectados ocasionalmente (Visbal et al. 2005). Entretanto, o itraconazol é sugerido pela Sociedade Brasileira de Medicina Tropical como a melhor alternativa para terapia de primeira linha no tratamento da PCM (Shikanai-Yasuda et al. 2006). O variconazol,

segunda geração de antifúngicos triazólicos, disponível nas apresentações oral e intravenoso, constitui uma alternativa terapêutica importante, principalmente nos casos de neuroparacoccidioidomicose, devido à sua boa penetração no sistema nervoso central. No entanto, o custo elevado torna sua utilização limitada (Shikanai-Yasuda et al. 2006; Queiroz-Telles et al. 1994).

Equinocandinas, tais como micafungina (Mycamine[®]; Astellas Pharma) ou caspofungina (Cancidas[®]; Merck), são antifúngicos que têm sido introduzidos na terapia de infecções fúngicas, tais como candidíase e aspergilose. Essa classe de fármacos apresenta como principal alvo a enzima 1,3- β -glicana sintase presente na parede celular de fungos. Sabe-se que a parede celular fúngica é essencial para sua sobrevivência, tornando essa classe de antifúngicos altamente específicos, visto a falta de quitina e β -1,3-glucana em mamíferos (Odds et al. 2003; Munro & Gow 2001). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) para caspofungina na fase leveduriforme de vários fungos dimórficos, oscilou de acordo com a espécie e isolado dentro da espécie (Espinel-Ingroff 1998). A suscetibilidade de *P. brasiliensis*, a esse medicamento parece estar correlacionada ao isolado do fungo (San-Blas & Niño-Vega 2007). *P. brasiliensis* apresentou-se resistente à ação de micafungina (Nakai et al. 2003). A CIM em sete isolados variou entre 4 e 16 μ g/ml para a fase miceliana e > 64 μ g/ml para a fase leveduriforme do fungo, demonstrando que a atividade antifúngica da micafungina depende da fase de crescimento do fungo, e particularmente, da estrutura da parede celular apresentada nas diferentes fases do fungo (San-Blas & Niño-Vega 2007).

A 5-flucitosina (5-FC) é um antimetabólito atualmente utilizado como um agente antifúngico (Krcmery 2005). A 5-FC é captada pela célula do fungo através da citosina permease sendo convertida em 5-fluorouracil (5-FU) pela citosina deaminase e posteriormente em ácido 5-fluorouridílico, o qual é fosforilado e incorporado ao RNA interferindo na síntese protéica. O 5-FU também é convertido em monofosfato de 5-fluorodeoxiuridina, um potente inibidor da timidilato sintase, enzima envolvida na síntese de DNA e em processos de divisão nuclear (Carillo-Muñoz et al. 2006). A 5-FC não é utilizada em monoterapia, devido ao alto índice de resistência a este fármaco, sendo administrado apenas em combinação com anfotericina B ou fluconazol (Krcmery 2005).

As alilalaminas (naftifina, terbinafina e butenafina) e tiocarbamatos (tolnaftato e tolciclato) atuam como inibidores competitivos da enzima esqualeno epoxidase (ERG1), a qual juntamente com a (2,3)-óxido esqualeno ciclase (ERG7), é responsável pela ciclização

do esqualeno a lanosterol. Sua inibição provoca uma depleção de ergosterol que afeta a estrutura e função da membrana plasmática (Geogopapadakou & Walsh 1996).

A pesquisa por novas terapias com antifúngicos tem sido realizada visando o tratamento das micoses (Moudgal & Sobel, 2010; Espinel-Ingroff, 2009). Inibidores como azasteróis e derivados têm se mostrado altamente efetivos como agentes antiproliferativos contra protozoários e alguns fungos, entre eles o *P. brasiliensis* (Visbal *et al.*, 2005; 2003). Pereira *et al.* (2010) identificaram o lanosterol como substrato preferencial para (24)-esterol metil transferase (SMT) de *P. brasiliensis* (*PbSMT*). Dessa forma, vários derivados do lanosterol foram sintetizados por síntese química e investigados quanto à capacidade inibitória das proteínas nativa e recombinante de *PbSMT*. Dentre eles, o 25-azalanosterol foi identificado como o inibidor mais potente.

A combinação de quimioterapia e Peptídeo 10 da gp43 de *P. brasiliensis* (P10), candidato à vacina contra a PCM, tem sido estudada como uma estratégia para tratamento da PCM humana (Rodrigues *et al.* 2009; Travassos *et al.* 2008).

Produtos naturais também têm sido utilizados como agentes antifúngicos alternativos e testes envolvendo compostos extraídos de plantas vêm sendo realizados para *P. brasiliensis*. O composto natural ajoene (4,5,9-trithiadodeca-1,6,11-trieno 9-óxido), presente no alho (*Allium sativum*), foi capaz de controlar a infecção por *P. brasiliensis*. Camundongos foram inoculados com 10^6 células do fungo por via intraperitoneal e tratados com ajoene. Após 2, 6, 10 e 13 semanas de tratamento, os níveis de anticorpos anti-*P. brasiliensis* foram medidos por ELISA e os animais foram sacrificados para a retirada de seus pulmões, fígado e baço, e posterior análise histopatológica e determinação do número de fungos viáveis. Os resultados mostraram que a PCM foi estabelecida e que o ajoene foi capaz de controlar a evolução da doença, reduzindo significativamente os níveis de anticorpos a partir da décima semana de tratamento (Maluf *et al.* 2008). Esse fato está associado com a redução de fosfatidilcolina, um concomitante aumento do seu precursor fosfatidiletanolamina e um grande aumento nos ácidos graxos insaturados na fase leveduriforme (Visbal *et al.* 2005). Em adição, ajoene possui atuação efetiva quando associado a antifúngicos (Thomaz *et al.* 2008).

Oenoteína B, obtida das folhas de *Eugenia uniflora*, foi avaliada por Santos *et al.* (2007) quanto a sua atuação em células leveduriforme de *P. brasiliensis*, utilizando-se bioensaios. O composto apresentou efeito antiproliferativo no fungo. Oenoteína B inibe a expressão do transcrito de 1,3- β -glicana sintase (*PbFKS1*), e induz alterações

morfológicas, como deformação da célula, extravasamento e depressão celular, rachaduras, superfície rugosa, rompimento e extravasamento do conteúdo celular após o colapso da parede celular. Essas alterações foram observadas em aproximadamente 90% da população das células analisadas em *P. brasiliensis*.

3. Plantas utilizadas com fins terapêuticos

Na tentativa da descoberta de novos compostos, muitos grupos de pesquisa têm buscado os extratos de plantas para detectar metabólitos com atividade biológica relevante (Alves et al. 2000). Atualmente, plantas medicinais têm sido utilizadas como fonte para analgésicos, anti-inflamatórios, anti-neoplásicos, antiasmáticos, antiarrítmicos e anti-hipertensivos (Webster et al. 2008). Entretanto, poucos estudos têm sido realizados visando avaliar a eficácia e os efeitos terapêuticos de extratos brutos ou componentes isolados (Napolitano et al. 2005).

O uso de produtos naturais, incluindo plantas com propriedades medicamentosas, vem se tornando cada vez mais importante nos cuidados da saúde, especialmente nos países em desenvolvimento. Muitas investigações farmacológicas têm levado à identificação de novos fármacos ou à busca de novas estruturas para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento de doenças humanas (Newman et al. 2003; Holetz et al. 2002). No tratamento quimioterápico, 74% das drogas são produtos naturais ou derivados (Tan et al. 2006). Os relatos na medicina popular costumam ser vistos como eficazes na identificação de espécies vegetais potencialmente terapêuticas, sendo utilizadas como orientadores das pesquisas com plantas medicinais (Harbone 1999).

O ajoene, derivado do *A. sativum*, tem sido estudado quanto à sua atividade antimicrobiana e em *P. brasiliensis*, este composto induz um efeito antiproliferativo (San-Blas et al. 1997). Estudos realizados por pesquisadores do nosso grupo, identificaram o bioproduto argenilactona, proveniente de *Hyptis ovalifolia* como inibidor da enzima nativa e recombinante de ICL do fungo *P. brasiliensis* (*PbICL*) (Prado et al. em preparação).

Compostos naturais provenientes de plantas também têm sido avaliados quanto à atividade antifúngica em outros fungos, como *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* e *C. albicans* (Pasqualotto & Denning 2008; Pauli 2006; Zehavi & Polacheck 1996). Extratos de plantas com propriedades medicinais (*Mentha longifolia*, *Mentha piperita*,

Prongos ferulaceae, *Galium verum*, *Salvia limbata*, *Artemisia austriaca*, *Urtica dióica* e *Plantago lanceolata*) utilizadas na medicina popular da Turquia, foram avaliados, quanto a sua ação em espécies de *Candida* (Yi it et al. 2008). Dentre os extratos estudados, os que apresentaram atividade inibitória contra espécies de *Candida* foram: *M. longifolia* e *A. austriaca* que mostraram atividade contra *C. albicans*; *P. lanceolata*, que apresentou efeito inibitório contra *C. albicans* e *Candida tropicalis*. *P. lanceolata* também inibiu *C. neoformans* (Braga et al. 2007). Dentre as espécies de *Candida* analisadas, *C. albicans*, foi a espécie mais sensível.

Brasil, Cuba, Índia, Jordânia, México são exemplos de países que possuem flora diversificada e rica; nesses países, as plantas têm sido utilizadas com agentes antifúngicos e antibacterianos (Rehder et al. 2004; Ahmad & Beg 2001). O Brasil é o país de maior diversidade do planeta, foi o primeiro signatário da convenção sobre diversidade biológica (CDB), é considerado pela Conservação Internacional (CI 1999) (<http://www.conservation.org.br>) como país megabiodiverso que congrega pelo menos 70% das espécies vegetais e animais existentes. A biota terrestre brasileira tem a flora mais rica do mundo, com 56.000 espécies de plantas (Ibama 2003) catalogadas e distribuídas nos seis maiores biomas, entre eles o Cerrado (Dias, 1996).

3.1. *E. uniflora* e Oenoteína B

A *E. uniflora* L., planta pertencente à família *Myrtaceae* (Figura 2), é uma árvore arbustiva, natural do Brasil, mas que pode ser encontrada, na Índia, China, Sri Lanka, Egito, Nigéria e outras regiões tropicais e subtropicais (De Moraes et al. 1996; El-Shabrawy 1995; Weyerstahl et al. 1988). No Brasil, esta espécie pode ser encontrada nos estados de Goiás, Bahia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Angely 1965).

A *E. uniflora* L. é conhecida popularmente como pitangueira (Lee et al. 1997). É uma planta de fruto comestível, muito conhecida e apreciada no Brasil, onde recebe as denominações de Pitanga, Ibitanga e Pitangatuba (Weyerstahl et al. 1988). Por ser de fácil crescimento, resistente a condições urbana e ornamental, a planta pode ser cultivada em casas, parques e jardins (Porcu & Rodrigues-Amarya 2008).



Figura 2: *E. uniflora* (Myrtaceae). A partir das folhas de *E. uniflora* (pitangueira) foi obtida a oenoteína B, avaliada neste trabalho (Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Eugenia_uniflora_fruit2.JPG).

Esta planta é bem conhecida no Cerrado brasileiro (Septímio 1994) e tem sido utilizada na medicina popular como antipirético e antireumático (Alice et al. 1991), anti-hipertensivo e diurético (Amat & Yajia 1991), no tratamento de distúrbios digestivos (Ratera & Ratera 1980; Bandoni et al. 1972), como adstringente (Bandoni et al. 1972), e como antimicrobiano (Coelho de Souza et al. 2004; Adebajo et al. 1989), incluindo micoses (Souza et al. 2002; Holetz et al. 2002).

A atividade antimicrobiana de *E. uniflora* foi avaliada em duas linhagens de *Escherichia coli* (EC 27 e ATCC 8539). A concentração inibitória mínima foi 1.024µg/ml para ambas as linhagens de *E. coli* analisadas. O efeito sinérgico entre o extrato alcoólico de *E. uniflora* e gentamicina, também foi observado nesse estudo mostrando a existência de um provável sinergismo entre os compostos (Coutinho et al. 2010).

Foi observado que os óleos voláteis das folhas de *E. uniflora* apresentam atividade antimicrobiana e antifúngica (Perez & Anesini 1994; Adebajo et al. 1989), no entanto, essa atividade também pode estar relacionada aos taninos presentes em diversas partes da planta (Inokuchi et al. 1985), e que, possivelmente, são extraídos das folhas durante as preparações populares, como infusões e decocções (Ahmad & Beg 2001).

Taninos condensados são conhecidos por sua capacidade de interação com os sistemas biológicos induzindo a algum efeito fisiológico, tais como anti-oxidante, anti-alérgico, anti-hipertensivo e antimicrobiano (Santo-Buelga & Scalbert 2000). Ácido tânico é um tanino hidrolisável típico que consiste da esterificação da glicose com moléculas de ácido gálico. Assim como os taninos condensados, o ácido tânico é conhecido por sua propriedade antimutagênica, anticancer e antioxidante (Srivastava et al. 2010). Estudos fitoquímicos das folhas de *E. uniflora* têm identificado a presença de ácido gálico e

triterpenos (Schikarski 1976), bem como de três taninos hidrolisáveis macrocíclicos, nomeados de oenoteína B, eugeniflorina D₁ e eugeniflorina D₂ (Figura 3), sendo que as duas últimas podem ser obtidas a partir de modificações moleculares da oenoteína B (Lee et al. 1997). Essas modificações podem aumentar a atividade biológica da oenoteína B, como observado na inibição da DNA polimerase do vírus Epstein-Barr (Lee et al. 2000).

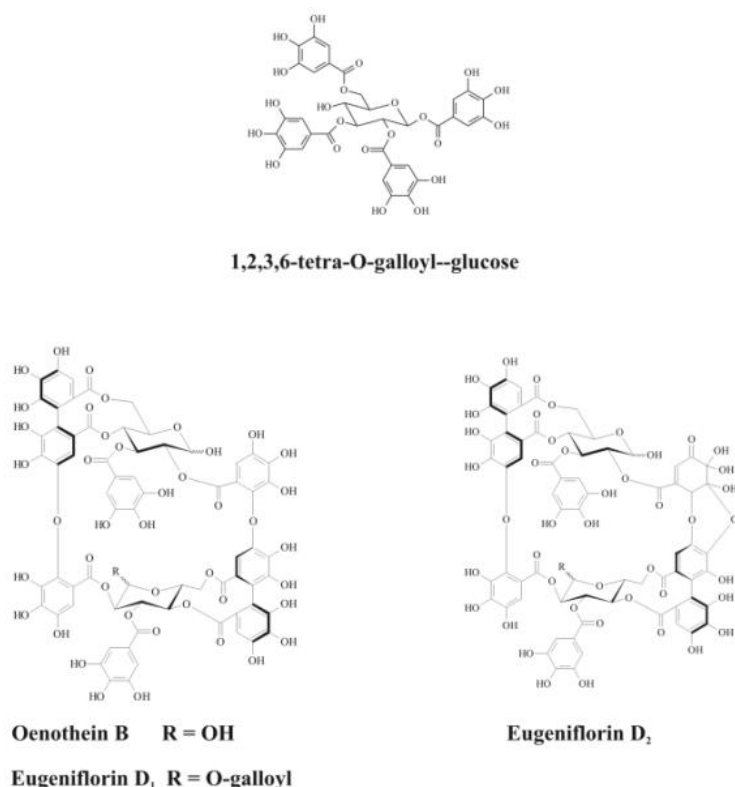


Figura 3: Estruturas químicas dos taninos obtidos das folhas de *E. uniflora*.

A oenoteína B foi isolada, primeiramente de *Oenothera* sp (Hatano et al. 1990), sendo conhecida por possuir notável atividade anti-tumoral, anti-viral HIV e HSV, e atividade supressora de genes responsáveis pelo desenvolvimento de câncer de mama em ratas (Taniguchi et al. 1998; Lee et al. 1997). Esse composto apresenta ainda, atividade inibidora de 5- α -redutase, enzima alvo para pesquisa de novos fármacos contra hiperplasia benigna prostática, cujos efeitos de inibição representam uma nova possibilidade para tratamento de adenoma e carcinoma prostáticos (Lesuisse et al. 1996). A atividade antibacteriana de oenoteína B, assim como de outros 40 taninos hidrolisáveis provenientes de plantas, foi demonstrada *in vitro* em *Helicobacter pylori* (Funatogawa et al. 2004).

Em *P. brasiliensis*, estudos mostraram que células leveduriformes do fungo apresentaram seu crescimento inibido quando expostas às frações, aquosa, metanólica solúvel e insolúvel, sub-fração IM-7 (insolúvel em metanol-7) e oenoteína B obtidas de *E. uniflora*, de maneira dose-dependente. Aproximadamente 90% de células leveduriformes de *P. brasiliensis* cultivadas na presença de oenoteína B e do extrato aquoso, apresentaram deformações observadas através de microscopias de varredura e transmissão, como extravasamento e depressão celular, rachaduras, superfície rugosa, rompimento e extravasamento do conteúdo celular após o colapso da parede celular. Deformações no interior das células também foram observadas, como presença de vacúolos grandes com baixa densidade, células lisadas, parede celular parcialmente rompida, organelas citoplasmáticas liberadas para o meio externo e alterações nas estruturas citoplasmáticas. Foram observadas ainda, células contendo rupturas ou dobras na membrana citoplasmática do fungo (Figura 4). Estudos realizados com alguns genes de *P. brasiliensis* utilizando a técnica de transcrição reversa semi-quantitativa seguida de reação em cadeia da polimerase (sqRT-PCR), demonstraram que oenoteína B inibiu os acúmulos de transcritos de 1,3- -glicana sintase (*PbFKSI*), enzima presente na membrana celular, a qual sintetiza o polímero de 1,3- -glicana depositado na parede celular do fungo (Santos et al. 2007).

3.2. RDA

Várias são as técnicas utilizadas a fim de estudar a expressão diferencial de genes em um determinado organismo ou identificar quais genes estão envolvidos em um determinado processo ou tratamento. Essas técnicas permitem detectar as mudanças na expressão de mRNAs sem qualquer conhecimento prévio de informações da sequência dos genes específicos em questão. Dentre os métodos utilizados para clonar genes diferencialmente expressos encontra-se a técnica do RDA (Hubank & Schatz 1994).

A técnica de RDA é um processo de subtração acoplado à amplificação, originalmente desenvolvido para uso com DNA genômico como um método capaz de identificar as diferenças entre dois genomas complexos (Hubank & Schatz 1994). O mesmo processo foi modificado, posteriormente, a fim de permitir análise de populações de mRNA diferencialmente expressos (Lisitsyn 1995). Baseado em *rounds* sucessivos de hibridização subtrativa, seguido por PCR (reação em cadeia da polimerase), esta técnica possui a

vantagem de elimina fragmentos presentes em ambas as populações de mRNAs, deixando apenas os genes expressos diferencialmente.

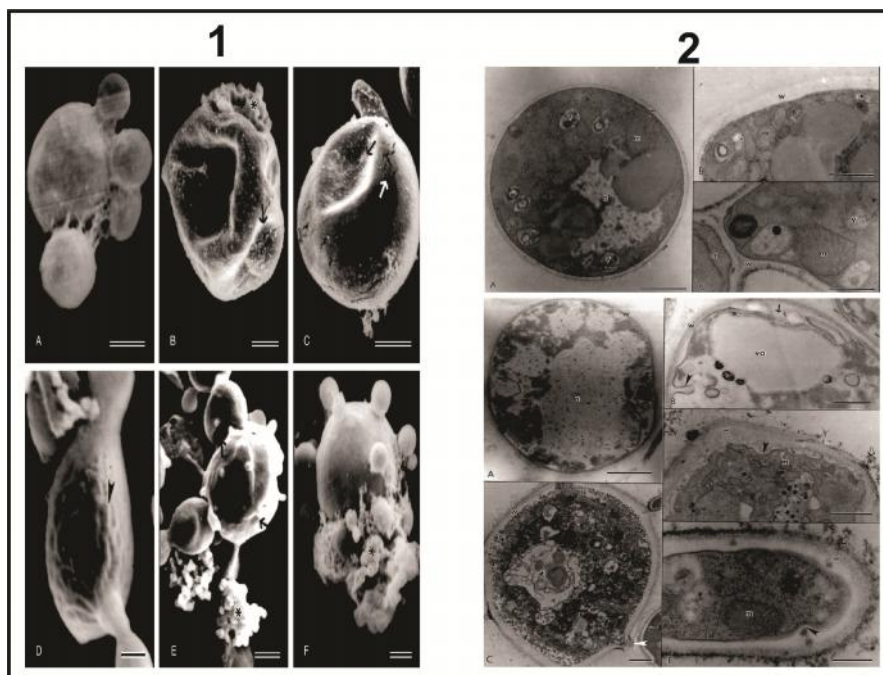


Figura 4: (1) Microscopia eletrônica de varredura das células leveduriformes de *P. brasiliensis*. (A) controle, (B e C) expostas ao extrato aquoso, onde se observa a presença de rachaduras (seta branca), extravasamento do conteúdo celular (asterisco), esmagamento e depressão (seta preta) na superfície celular. (D-F) oenoteína B, a superfície da célula apresenta-se rugosa (ponta da seta) observando-se a presença de esmagamento e depressão (seta preta), ruptura e extravasamento do conteúdo celular (asterisco). (2) **Microscopia eletrônica de transmissão de células leveduriformes de *P. brasiliensis*.** Na parte superior (A-C), uma célula leveduriforme típica com núcleo (n), mitocôndria (m), retículo endoplasmático (re), parede celular (w) com espessura uniforme e vacúolos pequenos (v) é observado. Na porção inferior, (A e B) fração aquosa, (C-E) oenoteína B. (A e B) Células leveduriformes cultivadas na presença da fração aquosa. (A) Observa-se a presença de aumento da estrutura nuclear (n) e ruptura da membrana citoplasmática (seta preta). (B) Dobras (seta preta) na membrana citoplasmática celular e vacúolos grandes (va), com quase nenhuma densidade, pode ser visualizado. (C-E) Células leveduriformes cultivadas na presença de oenoteína B. (C) Parede celular parcialmente rompida (seta branca) e mudanças nas estruturas citoplasmáticas (asterisco) podem ser observadas. (D e E) Mudanças na espessura da parede celular (w) e ausência (seta preta) da membrana citoplasmática celular foram observadas. Materiais altamente eletrodensos (seta vazia) são visíveis abundantemente e irregularmente depositados na superfície definida da célula do fungo. (Fonte: Santos et al. 2007).

O RDA se baseia na geração, por digestão com enzima de restrição e amplificação por PCR, de versões simplificadas dos transcriptomas sob investigação conhecidas como “representações”. Se um fragmento de restrição amplificável (o alvo) existe numa representação (*tester*) e está ausente em outra (*driver* – controle), um enriquecimento cinético do alvo pode ser alcançado por hibridização subtrativa do *tester* na presença de um excesso de *driver*. Sequências com homólogos no *driver* não são amplificadas, enquanto o alvo hibridiza apenas com ele mesmo e retém a habilidade de ser amplificável por PCR. Interações sucessivas da subtração e o processo de PCR produzem fragmentos de cDNA

visíveis num gel de agarose correspondendo ao alvo enriquecido (Hubank & Schatz 1994). Na técnica de RDA as populações de cDNA podem ser fracionadas por um número de enzimas de restrição com sequências curtas de reconhecimento para produzir conjuntos de cDNAs. Este aspecto do RDA melhora grandemente as chances de se clonar com sucesso espécies diferencialmente expressas. Além disso, pelo fato de que cada cDNA é restringido no seu comprimento para produzir fragmentos, o procedimento de RDA oferece múltiplas chances de se recuperar um gene de interesse. No entanto, assim como acontece em outras técnicas de obtenção de genes expressos diferencialmente, a técnica de RDA pode apresentar algumas desvantagens, como o aparecimento de falsos-positivos, porém trata-se de um procedimento relativamente barato e rápido (Pastorian *et al.*, 2000).

A técnica de RDA tem sido utilizada visando o conhecimento de genes expressos em diversas condições. Bailão *et al.* (2006) utilizaram a técnica de RDA a fim de identificar genes diferencialmente expressos de duas populações de cDNA, uma obtida a partir de células leveduriformes de *P. brasiliensis* provenientes de camundongos infectados e outra proveniente de células leveduriformes do fungo incubadas com sangue humano. As análises identificaram genes relacionados à aquisição de ferro, síntese de melanina e defesa celular.

Os genes envolvidos no processo infeccioso de *Trichophyton rubrum* foram analisados por Baeza *et al.* (2007), utilizando a técnica do RDA a partir de duas populações de cDNA, uma proveniente de RNA extraído do fungo exposto à queratina e outra obtida de RNA extraído do fungo cultivado em meio mínimo. Genes relacionados à transdução de sinal, proteína de membrana, resposta a estresse oxidativo e alguns prováveis fatores de virulência se apresentaram super-expressos.

Borges *et al.* (2010), utilizaram a técnica do RDA a fim de identificar genes diferencialmente expressos entre as células leveduriformes de dois isolados diferentes de *P. brasiliensis*, isolados *Pb01*, que se apresenta com morfologia características de células leveduriformes, e o isolado *Pb4940*, que se apresenta tipicamente na forma miceliana, sem a presença de conversão para a fase leveduriforme ao se alterar a temperatura de cultivo. A técnica foi utilizada a fim de compreender os eventos moleculares que ocorrem no fungo durante a resposta ao aumento de temperatura e estabelecimento da fase leveduriforme do isolado *Pb01*. Nesse trabalho, o isolado *Pb01* foi utilizado como *tester* e o isolado *Pb4940* como *driver*. Um total de 258 clones se mostram super-expressos para o isolado *Pb01*,

comparado ao isolado *Pb4940*, que correspondem a proteínas de membrana/parede celular, HSP30, C6 fator de transcrição (CTF1b) e fator de transcrição GATA (NSDD).

Faganello et al. 2009 utilizaram a técnica de RDA a fim de isolar sequências que representam diferenças no DNA genômico de *C. neoformans* var. *grubii* e *C. gattii*. Nesse estudo foram sequenciados, cerca de 200 clones, que permitiram a identificação de 19 sequências diferentes em relação ao genoma de *C. neoformans*. Dentre as sequências identificadas, genes envolvidos com o polimorfismo em espécies de *Cryptococcus* foram observados, como o gene codificante para IDE e quitina sintase.

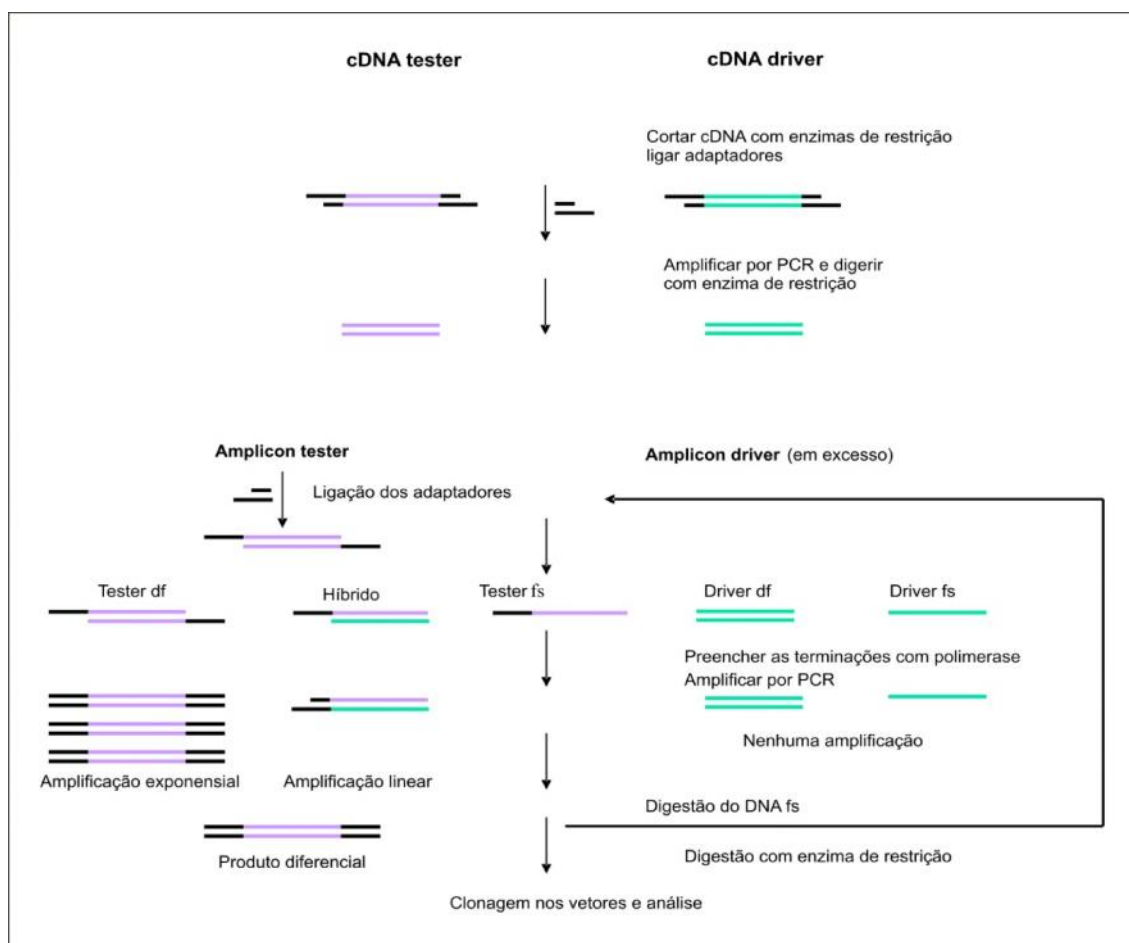


Figura 5 – Diagrama esquemático da metodologia do RDA. Os cDNAs são digeridos com enzima de restrição *Sau3AI* para gerar fragmentos amplificáveis por PCR e com sítios de restrição para ligar os adaptadores. Os produtos da digestão são purificados em sistema comercial GFX (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK), ligados aos adaptadores (16 h a 16 °C) e amplificados por PCR (25 ciclos de 45 s a 95 °C e 4 min a 72 °C, cada). Os produtos finais da reação de PCR são purificados com o sistema comercial GFX. Ambos, *tester* e *driver*, são digeridos com *Sau3AI* para remoção dos adaptadores e purificados antes da ligação de um novo par de adaptadores somente no *tester*. Para a geração do primeiro produto diferencial, *driver* e *tester* são hibridizados, numa relação de 10:1, por 16 h a 67 °C e amplificados por PCR (7 ciclos de 45 s a 95 °C e 3 min a 72 °C, cada). Os produtos são submetidos a uma nova etapa de amplificação (20 ciclos) em que os *testers* dupla fita (df) são exponencialmente amplificados, e os cDNAs fita simples (fs) são removidos. Para geração de um segundo produto diferencial, novos adaptadores são ligados ao primeiro produto diferencial, que é hibridizado ao *driver* numa relação de 100:1.

4. Caracterização de alvos para agentes antifúngicos

4.1. Ciclo do Glioxalato

A glicose é a fonte de carbono preferencial para muitos organismos, podendo ser convertida em um açúcar contendo cinco carbonos ou ser catabolizada a acetil-CoA através da glicólise. Entretanto, não é sempre que a glicose está disponível como fonte de carbono para os micro-organismos, sendo necessária a atuação de outras vias metabólicas para suprir as necessidades energéticas de acordo com a fonte de carbono disponível no ambiente (Cozzone 1998).

Uma das vias regulatórias utilizadas é o ciclo do ácido tricarboxílico, que resulta na geração de moléculas produtoras de energia, e também atua como reservatório de precursores metabólicos essenciais para a síntese de aminoácidos, ácidos graxos e açúcares. Esse ciclo pode ser regulado, e as enzimas envolvidas podem ser induzidas ou reprimidas de acordo com a necessidade da célula (Hamel & Appanna 2001).

Outra via que possui grande importância no processo regulatório é o ciclo do glioxalato (Figura 6), originalmente descrito por Kornberg & Krebs (1957) em bactérias crescidas em acetato. O ciclo do glioxalato trata-se de uma via alternativa ao ciclo do ácido tricarboxílico, oxidando acetato aos ácidos dicarboxílicos: succinato, malato e oxaloacetato (Flavell et al. 1971). A função do ciclo do glioxalato é sintetizar compostos contendo 4 carbonos a partir de compostos contendo 2 carbonos, tais como acetato e etanol (Kornberg 1966).

O acetil-CoA entra no TCA, onde é convertido, através de oito passos enzimáticos, em intermediários que alimentam numerosas vias biossintéticas, incluindo as vias para a síntese de aminoácidos, ácidos graxos e glicose (Lorenz & Fink 2002). Nesse processo participam enzimas comuns ao ciclo do ácido tricarboxílico e também as específicas do ciclo do glioxalato, a isocitrato liase (ICL) e a malato sintase (MLS). A enzima ICL catalisa a reação de clivagem do isocitrato a succinato e glioxalato. Em seguida, a enzima MLS condensa o glioxalato, com acetil coenzima A formando malato (Kornberg 1966).

O ciclo do glioxalato possui um papel importante na gliconeogênese (Kornberg & Beevers 1957), visto que o primeiro passo comprometido nessa via é à conversão de oxaloacetato à fosfoenolpiruvato através da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEP carboxinase) (Figura 6). Essa enzima e a frutose-1,6-bifosfatase são as mais importantes na gliconeogênese por atuarem como regulatórias na produção de glicose. Em *S. cerevisiae*, sob fagocitose, frutose-1,6-bifosfatase (*FBPI*) é altamente induzida (Lorenz & Fink 2001),

validando a idéia de que o primeiro objetivo na indução do ciclo do glioxalato é a produção de glicose.

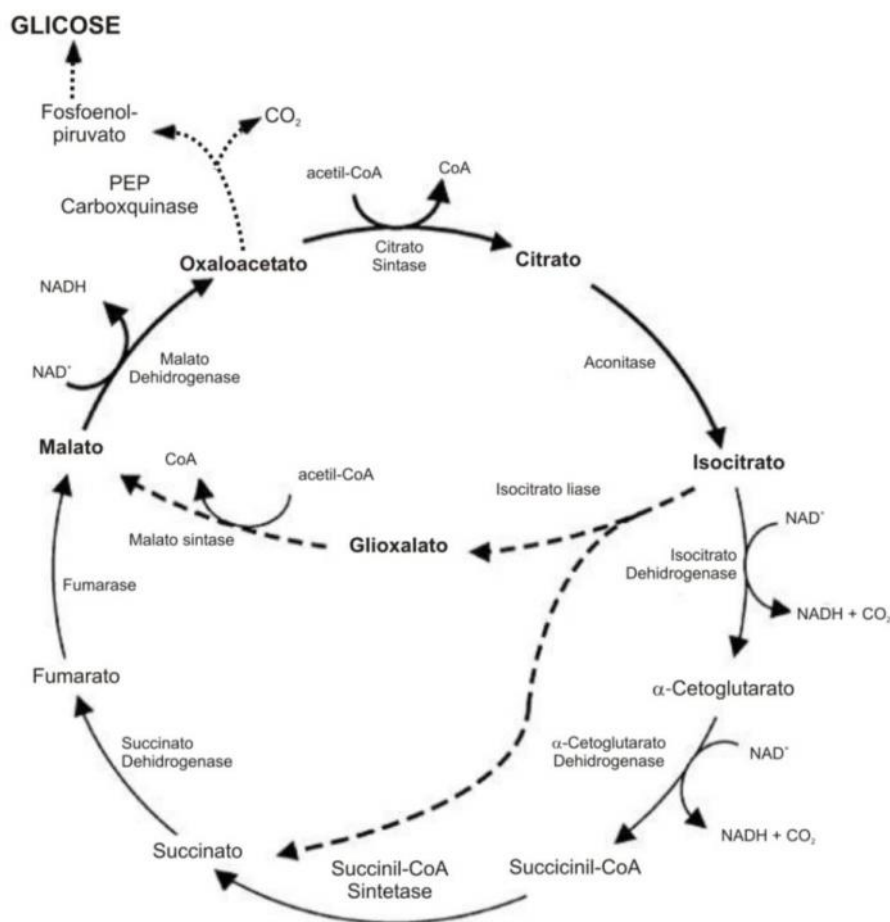


Figura 6: Esquema representativo do ciclo do ácido tricarboxílico, ciclo do glioxalato e gliconeogênese. Estão evidenciados os passos enzimáticos básicos no ciclo do ácido tricarboxílico (linhas finas), o qual é comum para todos os organismos; passos no ciclo do glioxalato (linhas tracejadas), o qual é comum para micro-organismos e plantas; passos compartilhados pelos dois ciclos (linhas grossas); e a reação inicial de gliconeogênese (linhas sombreadas). (Fonte: Lorenz & Fink 2002).

As enzimas do ciclo do glioxalato são induzidas após a fagocitose em *C. albicans* e *S. cerevisiae*, possibilitando a sobrevivência desses micro-organismos no interior de macrófagos (Lorenz & Fink 2002). Somente as enzimas exclusivas do ciclo do glioxalato são induzidas durante o processo de infecção embora existam enzimas comuns ao ciclo do ácido tricarboxílico (Minard & Mcalister-Henn 1991). Entretanto, o mesmo não é observado em resposta a meios condicionados, estresse oxidativo, ou contato com macrófagos inativados por aquecimento (Lorenz & Fink 2001). De acordo com Cozzone (1998), o macrófago é pobre em compostos complexos de carbono, mas são ricos em ácidos graxos e seus produtos de degradação, primeiramente acetil-CoA, os quais são

assimilados através do ciclo do glioxalato, confirmando ser a única rota de síntese de glicose nesse ambiente.

O ciclo do glioxalato e as enzimas ICL e MLS são importantes para a virulência de alguns patógenos, como *C. albicans* (Lorenz & Fink 2002), *C. neoformans* (Rude et al. 2002) e o fungo fitopatogênico *Leptosphaeria maculans* (Idnurn & Howlett 2002). A enzima ICL foi encontrada super expressa no transcriptoma de *P. brasiliensis* realizado a partir de células leveduriformes do fungo recuperada de camundongos infectados, mostrando a atuação do ciclo do glioxalato no processo infectivo da doença (Costa et al. 2007).

Estudos utilizando isolados de *C. albicans* coletados de três grupos de pacientes apresentando candidíase em regiões diferentes do corpo, mostraram que as enzimas ICL e MLS apresentaram atividade em todos os casos analisados, confirmando a presença do ciclo do glioxalato como fator de virulência para o fungo. Porém, os níveis de atividade dessas enzimas se apresentaram alterados de acordo com o local da infecção. Estudos utilizando isolado de *C. albicans* proveniente de pacientes diabéticos desenvolvendo candidíase vulvovaginal apresentaram níveis de atividade das enzimas ICL e MLS mais elevados quando comparado a isolado obtido da cavidade orofaríngea dos pacientes HIV/AIDS e da pele de pacientes queimados (Lattif et al. 2006).

Em *Tuber borchii*, os transcritos de ICL e MLS foram encontrados super expressos quando o fungo foi cultivado na presença de acetato e etanol, indicando que o ciclo do glioxalato era induzido na presença de fontes de 2C (Abba et al. 2007).

Estudos a fim de identificar um inibidor para o ciclo do glioxalato em *Leptosphaeria maculans*, um fungo fitopatogênico, foram realizados em *Brassica oleracea* var. *botrytis*. Os pesquisadores realizaram uma modelagem molecular com a finalidade de desenvolver peptídeos como um candidato a agente indutor de resistência contra *L. maculans* em *B. oleracea* var. *botrytis*, baseado-se no sítio de interação da ICL com seu substrato isocitrato. Foi demonstrado que a inibição de isocitrato, ligado à ICL previne a ação do ciclo do glioxalato que é essencial para o metabolismo de *L. maculans* em *B. oleracea* var. *botrytis*. Esse bloqueio do ciclo do glioxalato provavelmente inibe o crescimento do fungo sem causar efeito à planta (Srivastava et al. 2010).

4.2. Via de degradação da alantoína

O nitrogênio é um dos componentes presentes na maioria das estruturas de macromoléculas dos organismos vivos. Assim, a maioria dos organismos, procariotos e eucariotos, possuem mecanismos de controle elaborados para proporcionar um suprimento constante de nitrogênio. Os fungos podem usar uma grande diversidade de compostos como fonte de nitrogênio utilizando muitos caminhos diferentes. Estudos de metabolismo do nitrogênio, e sua regulamentação, têm sido realizados em *S. cerevisiae*, *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa* (Marzluf 1997).

Alguns compostos de nitrogênio – amônia, glutamina e glutamato – são, preferencialmente, utilizados por fungos como fonte de nitrogênio. Porém, quando essas fontes primárias não se encontram disponíveis ou se encontram presentes em baixas concentrações, muitas outras fontes de nitrogênio podem ser utilizadas, como: nitrato, nitrito, purinas, amidos, a maioria dos aminoácidos e proteínas (Marzluf 1997). Prolina também pode ser utilizada como fonte de nitrogênio, por alguns fungos. *A. nidulans*, utiliza prolina como fontes de carbono e nitrogênio (Hull et al. 1989; Sophianopoulou & Scazzocchio 1989). Porém, em *S. cerevisiae*, prolina serve apenas como fonte de nitrogênio, não fornecendo assim carbono para o micro-organismo (Des Etages 1996).

Purinas são os principais componentes dos nucleotídeos e são sintetizadas a partir do fosforibosilpirofosfato, aminoácidos, CO₂ e formato (Nygaard 1983). A degradação das purinas, em CO₂ e amônia, ocorrem naturalmente em alguns organismos, no entanto, em outros, esse processo ocorre parcialmente por meio de seus intermediários, através de vias alternativas (Wu et al. 1989; Keilin 1959). *S. cerevisiae* utiliza a alantoína como fonte de nitrogênio, tendo ainda, a capacidade de estocá-la. Os genes necessários para a utilização da alantoína são induzidos por compostos intermediários que podem ser degradados a alofanato (Cooper et al. 1987).

O primeiro experimento realizado para estudar a degradação de purinas e seus catabólitos por micro-organismos foi realizado por Wohler (1853), que inoculou uma solução de alantoína com uma levedura não identificada, identificando a presença de amônia, uréia, oxalato e carbonato, entre os produtos finais formados.

Em *E. coli*, as purinas são degradadas produzindo alantoína (Vogels & van der Drift 1976). A alantoína é utilizada como fonte de nitrogênio em condições de crescimento anaeróbio. *S. cerevisiae* é capaz de utilizar alantoína como única fonte de nitrogênio, pelo

fato de ser capaz de degradá-la em amônia, glioxalato e dióxido de carbono (Cooper et al. 1979). Para a assimilação de nitrogênio, alantoína é primeiro convertido a ureidoglicolato por alantoinase e alantoato amino-hidrolase (Chang et al. 1993; Vogels & van der Drift 1976). Em *Bacillus fastidiosus*, o ureidoglicolato é degradado em glioxalato e uréia (Xu et al. 1995). A uréia pode ser o produto final da degradação ou ser metabolizada pela enzima urease, em amônia e dióxido de carbono. O glioxalato é, então, incorporado ao carbono celular (Bongaerts & Vogels 1976).

Em *S. cerevisiae*, glioxalato é produzido utilizando fontes de 2 carbonos e através metabolismo de nitrogênio (Cooper 1982; Fraenkel 1982). Acetil-CoA, produzido pelo catabolismo de fontes de carbono não-fermentáveis, como ácidos graxos, etanol e acetato, é condensado com glioxalato para produzir malato. Essa condensação irreversível é catalisada pela enzima MLS (Fraenkel 1982). O malato produzido dessa forma é utilizado como precursor da gliconeogênese, sendo convertido para glicose ou seus metabólitos por meio do fosfoenolpiruvato (Fraenkel 1982). Outra função do malato é que este pode ser convertido em isocitrato, reabastecendo os intermediários do TCA, fornecendo, desta forma, uma fonte de glioxalato pela reação da ICL (Erasco & Gancedo 1984). Glioxalato é também produzido, quando alantoína é metabolizada como fonte de nitrogênio (Cooper 1982), por meio da reação reversível catalisada por ureidoglicolato hidrolase (Gaudy et al. 1965).

4.3. A enzima MLS

A enzima MLS (EC 2.3.3.9) catalisa a reação de condensação que produz malato a partir de acetil-CoA e glioxalato; essa reação é altamente específica para esses substratos e requer Mg^{2+} como um cofator (Nogales et al. 2004). A MLS é uma enzima fundamental do ciclo do glioxalato, e também está envolvida na degradação de purinas, convertendo o glioxalato produzido do ácido úrico, alantoína e ácido alantóico, em malato (Hartig et al. 1992) que pode participar do ciclo do ácido tricarbóxico ou ciclo do ácido dicarbóxico (Ornston & Ornston 1969).

As MLSs são classificadas em três famílias baseadas no tamanho da sequência de aminoácidos. As maiores das MLSs conhecida, de fungos, bactérias e plantas superiores se agrupam no clado das MLSs com tamanho intermediário (Howard et al. 2000). Com base nas características das sequências de aminoácidos, as MLSs podem se dividir ainda,

em duas principais famílias, as isoformas A (MSA) e G (MSG). MSA, com massa molecular em torno de 65 kDa, ocorre em bactérias, como por exemplo, *E. coli* (Kornberg 1966), em fungos, como *S. cerevisiae* (Lorenz & Fink 2001), e plantas superiores, como o pepino (*Cumcumis sativus*) (Eastmond & Graham, 2001). MSG possui massa molecular em torno de 80 kDa, ocorrendo somente em bactérias (Nakazawa et al. 2005).

Alguns micro-organismos possuem duas classes de MLSs, sendo codificadas por genes diferentes, como em *E. coli*, onde *aceB* codifica a forma A, a qual é predominante em células crescidas em meio contendo acetato, e *glcB* codifica a forma G, uma proteína monomérica induzida pelo glicolato (Molina et al. 1994). Em *E. coli*, o operon *aceBAK* contendo os genes ICL (*aceA*) e MLS (*aceB*) é reprimido por glicose e induzido por acetato ou ácidos graxos (Clark & Cronan 1996).

Hartig et al. 1992, identificaram duas isoenzimas que codificam MLS em *S. cerevisiae*, *MLS1* e *DAL7*. *MLS1* se apresentou super expressa na presença de fontes de carbono, como acetato, indicando que essa isoenzima participa do ciclo do glioxalato. No entanto, a segunda MLS encontrada nesse micro-organismo, *DAL7*, se mostrou super expressa na presença de fontes de nitrogênio, como prolina, indicando seu envolvimento na via de degradação da alantoína.

Nakazawa et al. (2005) purificaram uma proteína com massa molecular de 116 kDa, que codifica uma MLS de *Euglena gracilis* crescida na presença de etanol. Entretanto, sua localização é mitocondrial, e não glioxissomal, como descrito em fungos (Szabo & Avers 1969) e plantas superiores (Beevers 1980). Essa localização mitocondrial de EgGCE é confirmada pela presença do peptídeo sinal de endereçamento para a mitocôndria. Em contraste, Woodcock & Merret (1978) isolaram outra MLS de *E. gracilis* crescida na presença de acetato; essa proteína apresenta massa molecular de 175 kDa e está localizada em glioxissomos (Liu et al. 1995).

Kunze et al. (2002) mostraram que Mls1p encontrava-se presente no citoplasma quando células de *S. cerevisiae* foram crescidas na presença de etanol. Entretanto, quando as células eram crescidas na presença de ácido oléico, Mls1p apresentou localização peroxissomal. Em *Corynebacterium glutamicum* MLS e ICL são essenciais para o seu crescimento na presença de acetato, etanol e ácidos graxos (Arndt et al. 2008).

A estrutura tridimensional de MSG de *E. coli* foi elucidada através de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) (Tugarinov et al. 2002). MSG é uma proteína globular multimérica apresentando uma estrutura TIM barril 8/ 8. O sítio ativo de MSG está

localizado em uma cavidade na interface entre a região C-terminal e os *loops* no final da região C-terminal das folhas do TIM barril (Howard et al. 2000). Essa posição do sítio ativo está coerente com as posições descritas em outras enzimas que contêm a estrutura de TIM barril; o sítio ativo está localizado dentro dos *loops* no final do barril (Branden & Tooze 1991). Em *E. coli*, os resíduos conservados do sítio ativo, Glu427 e Asp455, os quais se ligam ao íon magnésio, Arg338 que uni o hidrogênio ao oxigênio aldeídico do glioxalato, e a base catalítica proposta, Asp631, são conservados entre as sequências de MLSs conhecidas. Os domínios críticos para a atividade de MLS parecem ser o domínio do barril e a ligação C-terminal que cobre o sítio ativo, e que também contribui para a base catalítica proposta (Asp631). O domínio C-terminal é composto por 589 resíduos; o *loop*, formado pelos resíduos 577-588 parece ser flexível, permitindo o movimento do domínio para o restante da enzima. Tal movimento permite a abertura do sítio ativo para entrada do substrato e liberação do produto (Howard et al. 2000).

Na bactéria marinha *Colwellia maris*, a MLS é descrita como uma enzima dimérica composta por subunidades de 76,3 kDa, com temperatura ótima de 45°C, característico de enzima mesofílica, e possui parâmetros cinéticos alterados após a redução da temperatura (Watanabe et al. 2001). Nas bactérias *Acinetobacter calcoaceticus* e *C. glutamicum* MLS se apresenta como uma proteína monomérica com massa molecular de 75 kDa (Park et al. 1986) e 82 kDa (Reinscheid et al. 1994), respectivamente. Em *Fomitopsis palustris*, um fungo basidiomiceto, a MLS apresenta-se na forma de um octâmero, com massa molecular de 520 kDa, distribuídas em oito subunidades de 65 kDa. Essa enzima apresentou afinidade para ambos os substratos, glioxalato (K_m de 45 μ M) e acetil-CoA (K_m de 2,2 μ M) (Munir et al. 2002).

Da Silva Neto et al. (2009) mostraram, recentemente, que a MLS de *P. brasiliensis* (*PbMLS*) se encontra associada à superfície celular do fungo, onde foi capaz de se ligar a componentes da matriz extracelular. A propriedade de adesina de *PbMLS* foi demonstrado através de *Far-Western*, ELISA e ensaios de ligação, que mostraram que a proteína recombinante reconheceu as proteínas presentes na matriz extracelular, fibronectina e colágeno tipo I e IV, assim como células epiteliais pulmonares. Esse evento indica que *PbMLS* pode ter um papel de interação do fungo com componentes do hospedeiro. Os estudos revelaram a presença da enzima na porção solúvel e em filtrado de cultura celular, sugerindo que *PbMLS* é secretada por *P. brasiliensis*. Microscopia confocal a laser foi realizado a fim de identificar os acúmulos de *PbMLS* em células leveduriformes do fungo

crescidas em diferentes fontes de carbono. Os resultados mostraram que o acúmulo de *PbMLS* foi maior em células leveduriformes do que na fase miceliana. O acúmulo de *PbMLS* foi maior em células leveduriformes cultivadas na presença de acetato.

As enzimas *MLS* e *ICL* têm sido descritas como fatores de virulência em vários patógenos humanos (Olivas et al. 2007; Rude et al. 2002; Lorenz & Fink 2002), particularmente em *M. tuberculosis* (Graham & Clark-Curtss 1999). Genes que codificam essas enzimas são induzidos na fagocitose em *C. albicans* e *S. cerevisiae* (Lorenz & Fink 2002).

Estudos com pacientes da Índia revelaram que *MLS* é um antígeno imunodominante reconhecido por 80% dos pacientes imunodeficientes, evidenciando que o ensaio de sorodiagnóstico baseado na *MLS* pode ser utilizado como técnica suplementar à microscopia no diagnóstico rápido da tuberculose (Achkar et al. 2006).

Wanchu et al. (2008) mostraram que anti-*MLS* de *M. tuberculosis* tem alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de tuberculose de pacientes em regiões endêmicas, além de um grande potencial para identificar a tuberculose sub-clínica em pacientes considerados de alto risco para a doença.

JUSTIFICATIVAS

P. brasiliensis é um fungo termodimórfico e agente causador da PCM, uma micose humana sistêmica, crônica e progressiva prevalente na América Latina (San-Blas et al. 2002; Brummer et al. 1993). O tratamento prolongado da doença, a alta toxicidade dos medicamentos, e o aparecimento de isolados resistentes ou multi-resistentes (Hahn et al. 2003) têm complicado o tratamento de doenças infecciosas, incluindo PCM (Corti et al. 2003), e levado à necessidade do desenvolvimento de novos fármacos.

O uso de plantas medicinais no mundo, contribui significativamente, para os cuidados de saúde primária, principalmente anti-inflamatórios, antimicrobianos e antitumorais (Santos Pimenta et al. 2003; Holetz et al. 2002; Suyenaga et al. 2002). *E. uniflora* L., conhecida como pitangueira, é uma planta encontrada em regiões tropicais, como o Cerrado Brasileiro. Nosso grupo tem realizado o fracionamento das folhas de *E. uniflora* e testado, através de bioensaios, as frações e o composto ativo purificado, oenoteína B, no crescimento e viabilidade de *P. brasiliensis*. A ação dessa substância na expressão de genes do fungo tem sido estudada, mostrando que o composto, inibe o acúmulo de transcritos de 1,3- glicana sintase (*Pbfks1*). Estudos de microscopia eletrônica de varredura mostraram alterações características de inibidores de 1,3- glicana sintase ocorridas na morfologia das células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Os resultados mostraram que oenoteína B afetou as células leveduriformes de maneira dose-dependente (Santos et al. 2007).

A busca por alvos para agentes antifúngicos presentes em micro-organismos e ausentes em humanos tem levado à avaliação da atuação de genes em diferentes vias metabólicas.

Micro-organismos são capazes de crescer em fontes de carbono não-fermentáveis, como acetato, etanol e ácidos graxos, uma vez que possuem o ciclo do glioxalato, via metabólica que utiliza fontes de dois carbonos. Duas enzimas são específicas do ciclo do glioxalato, MLS e ICL. MLS catalisa a reação de condensação que produz malato a partir de acetil-CoA e glioxalato. MLS também se encontra envolvida na degradação de purinas, convertendo o glioxalato produzido a partir de ácido úrico, alantoína e ácido alantóico em malato, que pode participar do ciclo do ácido tricarboxílico ou ciclo do ácido dicarboxílico.

Estudos recentes mostraram que MLS de *P. brasiliensis* (*PbMLS*) se encontra associada à superfície celular do fungo, onde foi capaz de se ligar a componentes da matriz extracelular, como fibronectina e colágeno tipo I e IV, assim como as células epiteliais

pulmonar. Os estudos revelaram ainda a presença da enzima na porção solúvel e em filtrado de cultura celular, sugerindo que *PbMLS* é secretada por *P. brasiliensis*. Análises de microscopia confocal a laser identificaram o acúmulo de *PbMLS* em células leveduriformes do fungo crescidas em diferentes fontes de carbono; o acúmulo de *PbMLS* foi maior em células leveduriformes, cultivadas na presença de acetato (Da Silva Neto et al. 2009).

O fato de oenoteína B ter causado danos à nível de parede e membrana celular de *P. brasiliensis* sugere que esse composto possa ser um bom candidato a agente antifúngico, tornando-se relevante a elucidação do modo de ação desse composto sobre *P. brasiliensis*. Da mesma forma o conhecimento da atuação de *PbMLS* em diferentes vias metabólicas de *P. brasiliensis* se faz importante, visto que a presença de *PbMLS* na superfície celular de células leveduriformes do fungo e também sua ausência em humanos, sugere que *PbMLS* possa ser um candidato à alvo de agente antifúngico.

OBJETIVOS

Visando estudar o mecanismo de ação da oenoteína B em *P. brasiliensis* em resposta ao composto oenoteína B, propomos os seguintes objetivos:

- Identificar o sinergismo existente entre oenoteína B e os anti-fúngicos anfotericina B, itraconazol, sulfametoxazol e a combinação trimetoprim-sulfametoxazol, utilizados no tratamento da PCM.
- Utilizar a metodologia de RDA e células leveduriformes de *P. brasiliensis* crescidas na presença e na ausência de oenoteína B obtida de *E. uniiflora*;
- Sequenciar as ESTs de *P. brasiliensis* obtidas pela técnica de RDA;
- Identificar os genes induzidos e reprimidos em *P. brasiliensis* na presença de oenoteína B;
- Validar os genes induzidos e reprimidos em *P. brasiliensis* na presença de oenoteína B;

Visando investigar a atuação de *PbMLS* no metabolismo de *P. brasiliensis*, propomos os seguintes objetivos:

- Clonagem e Caracterização da sequência codificante para *PbMLS* de *P. brasiliensis*;
- Determinação do número de cópias da *PbMLS* através de *Southern blot*;
- Análise da expressão de *PbMLS* em diferentes fontes de carbono, através de RT-PCR_{sq}, *Western blot*, e atividade enzimática;
- Análise da expressão de *PbMLS* em fontes de nitrogênio, através de RT-PCR_{sq}, *Western blot*, e atividade enzimática.



CAPÍTULO II

Manuscrito - Transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* induced by oenothein B, a potential antifungal agent from the Brazilian Savannah plant *Eugenia uniflora*

Transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* induced by oenothain B, a potential antifungal agent from the Brazilian Savannah plant *Eugenia uniflora*

Patrícia Fernanda Zambuzzi-Carvalho¹, Suzana Costa Santos², Pedro Henrique Ferri², Clayton Luiz Borges¹, Célia Maria de Almeida Soares¹ and Maristela Pereira^{1*}.

¹ Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia, GO, Brazil. ² Laboratório de Bioatividade Molecular, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia, GO-Brazil.

*Corresponding author: Maristela Pereira. Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, ICBII, Campus II, Universidade Federal de Goiás, C.P. 131, 74001-970 Goiânia, GO, Brazil. Phone/fax: +55 62 35211110. *E-mail address*: mani@icb.ufg.br

Abstract

The active compound oenothain B, isolated from leaves of *Eugenia uniflora*, a Brazilian Savannah plant, has been evaluated on growth, viability and gene expression of *Paracoccidioides brasiliensis*. The compound interferes with yeast cell morphology and decreased α -1,3-glucan synthase transcripts. In the present study, the synergism of oenothain B with drugs currently used in the treatment of PCM was evaluated by test sensitivity plate. The greatest inhibition occurred in the presence of oenothain B associated with sulfamethoxazole/trimethoprim followed by amphotericin B, itraconazole and sulfamethoxazole, respectively, shown a putative synergic effective alone the compounds. The transcriptional profiling experiments were also realized in order to elucidate the response of oenothain B to the fungus *P. brasiliensis* by Representational Difference Analysis (RDA) technique. Treatment of *P. brasiliensis* for 90 min with oenothain B resulted in the identification of 463 ESTs up regulated clustered in 35 contigs and 25 singlets and 121 ESTs down regulated, clustered 15 contigs and 11 singlets. After 180 min of treatment, 301 ESTs were up regulated and 143 down regulated, clustered in 20 contigs and 13 singlets and 13 contigs and 6 singlets, respectively. Analyses indicated the presence of transcripts with functions related to cell wall and membrane, transcription factors, genes of stress response, cell morphology and hypothetic proteins.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, antifungal, oenothain B, representational difference analysis, transcriptome, savannah plant.

Introduction

Paracoccidioides brasiliensis causes paracoccidioidomycosis (PCM), a human systemic granulomatous disease, prevalent in Latin America, where up to 10 million individuals are infected (Brummer *et al.*, 1993; Restrepo *et al.*, 2001; San-Blas *et al.*, 2002). The infection is acquired by inhalation of airborne propagules of the mycelia phase, which reach the lungs and differentiates into the yeast phase.

The treatment of PCM is lengthy, starting with an aggressive dosage of antifungal agents, to which a maintenance treatment follows for months or years (Hahn *et al.*, 2003). The classic drugs used for PCM treatment are sulfonamides, amphotericin B and imidazolic derivatives, such as ketoconazole, itraconazole and fluconazole (Ramos-e-Silva and Saraiva, 2008). The drugs used in the fungal infections has not provide an effective therapy (Karen & Ernst, 2004), since resistant or multi-resistant strains have emerged (Hahn *et al.*, 2003) and the high toxicity of these drugs have further complicated the treatment of patients, mainly of the immunocompromised (Corti *et al.*, 2003). In this way, the search of new drugs becomes necessary. Several plants have been used for traditional treatment of different types of diseases, offering a large potential source of new therapeutic agents (Dasgupta & Benard, 2006).

Eugenia uniflora L. is a plant very well known in the Brazilian savannah (Septímio, 1994) and have been used in the popular medicine for a variety of diseases (Bandoni *et al.*, 1972; Alice *et al.*, 1991; Amat & Yajía, 1991; Souza *et al.*, 2002; Holetz *et al.*, 2002; Coelho de Souza *et al.*, 2004). Oenothin B is macrocyclic hydrolysable tannin dimer, isolated from leaves of the *E. uniflora*, and shown to have displays antimicrobial activity (Funatogawa *et al.*, 2004), host-mediated antitumor activity (Miyamoto *et al.*, 1987), suppression of mouse mammary tumor gene expression (Aoki *et al.*, 1995) and inhibits 5 α -reductase activity, enzyme related to benign prostatic hyperplasia (Lesuisse *et al.*, 1996).

Bio-guided assays identified oenothain B from *E. uniflora* leaves. Santos *et al.*, (2007) have shown that the aqueous, soluble and insoluble metabolic fractions, sub-fraction IM-7 and oenothain B from *E. uniflora* inhibited the *P. brasiliensis* growth. About 90% of the yeast cells of *P. brasiliensis* showed deformations, including squashing and depression, cracking, rough surface, flat appearance, disruption, and leakage of cellular contents after collapse of cell wall. The cell surface either flattened or wrinkled resulting in irregular thickened shapes. Typical swollen and irregular-shaped cells were also observed. The transmission electron microscopy identified cell walls partly disrupted and cytoplasmic organelles leaked out of the cell. In addition, oenothain B inhibited the accumulation of 1,3- β -glucan synthase (*Pbfks1*) transcript, which synthesizes 1,3- β -glucan polymer deposited in the *P. brasiliensis* cell wall (Santos *et al.*, 2007).

The aim of this work was to observe the existence of the synergism of oenothain B associated with antifungals used on PCM treatment was investigated and to elucidate the response of action of oenothain B, by using Application of DRA technique making possible the knowledge of *P. brasiliensis* genes involved on this process.

Methods

Plant material

E. uniflora leaves were collected in Anápolis City, Goiás State and voucher specimens were deposited at the Herbarium of the Universidade Federal de Goiás UFG, with code number UFG 25477. Access authorization and sample remittance of component of the genetic property is nº 005/2007.

Extraction, isolation and identification of oenothien B from *E. uniflora*

Powdered air-dried leaves of *E. uniflora* (1.0 kg) were extracted with 50% aqueous acetone. A dry crude extract (174.27 g) was obtained by concentration in vacuum followed by freeze-drying and a part (150 g) was extracted with ethyl acetate (AcOEt). The aqueous layer was lyophilized to yield a 122.14 g fraction which was dissolved in methanol (MeOH) to separate the soluble (81.76 g) and the insoluble (39.22 g) methanolic fractions. The insoluble fraction (10 g) was submitted to separation and purification by CC on Diaion HP-20, followed by CC on Sephadex LH-20, eluted with a water-MeOH gradient to obtain the IM-7 sub-fraction (791.5 mg). From this, oenothien B (62.4 mg) was isolated as a pure component (96%) on a preparative HPLC system. The chromatographic system consisted of LC-10ADvp pumps (Shimadzu Corp., Japan) connected to an SPD-10AVvp ultraviolet photodiode array detector. Chromatographic separations were performed using a LiChrospher RP-18 column (Shimadzu Corp., Japan). The compounds were eluted using acetonitrile (A) 0.01 M H₃PO₄: 0.01 M KH₂PO₄ (B) (gradient 8% A in B to 18%) for 20 min at a flow rate of 1.0 ml/min.

Microorganism

P. brasiliensis isolate Pb01 (ATCC MYA 826) has been studied in our laboratory (Pereira *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2007; Zambuzzi-Carvalho *et al.*, 2009; Da Silva Neto *et al.*, 2009) was obtained from a patient with PCM and first described by Dr. Maria do Rosário Rodrigues Silva in the Mycology Laboratory at the Institute of Tropical Pathology and Public Health of the Federal University of Goiás (IPTSP / GO) (Silva *et al.*, 1994).

Culture and cell viability

P. brasiliensis yeast cells were sub-cultured every seven days on solid Fava-Netto medium (1% w/v peptone, 0.5% w/v yeast extract, 0.3% w/v protease peptone, 0.5% beef extract, 0.5% w/v NaCl, 4% w/v glucose and 1.4% w/v agar, pH 7.2) (Fava-Netto, 1955) at 37°C and used throughout this study. For viability experiments, yeast cells were grown in the presence or in the absence of oenothain B, and were kept in broth McVeigh Morton (MMcM) chemically defined medium (Restrepo & Jiménez, 1980) for 60, 90, 120, 180, 240 and 300 min at 37°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.

Synergism between oenothain B and the antifungals amphotericin B, itraconazole, sulfametoxazole and combination of sulfamethoxazole/trimethoprim

Sensitivity test on plate was performed to evaluate the synergism between oenothain B and antifungals used in the treatment PCM such as amphotericin B, itraconazole, sulfametoxazole and the combination sulfamethoxazole/trimethoprim. The drugs concentrations were determinate from inhibition assays by macro dilution in broth method according the CLSI M27-A2 (Clinical and Laboratory Standards Institute, formerly NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards), with modifications.

The inhibition assays were performed using *P. brasiliensis* yeast cells grown in MMcM solid medium, for 7 days, at 36°C and inoculated in MMcM liquid broth medium. The stock solutions (1mg/ml) of amphotericin B, itraconazole, sulfametoxazole and the combination sulfamethoxazole/trimethoprim (Bactrim[®]), were prepared with DMSO 2%,

as solvent. The stock solution of oenothien B was prepared with MilliQ water. All the solutions were prepared and filtered at the moment of use.

Serial dilution of each compound, was realized singly from the solutions stock previously prepared using MMcM broth medium as diluents, yet added of the appropriate antibiotics in order to obtain the concentration of each compound varying of 0.0625 – 4 µg/ml (0.08 – 5 mM) and 0.25 – 4 µg/ml (0.4 – 6 mM) to amphotericin B and itraconazole, respectively (Hahn & Hamdan, 2000), 1.25 – 320 µg/ml (5 – 1260 mM) and 10 – 640 µg/ml (20 – 1200 mM) to sulfametoxazole and the combination sulfamethoxazole/trimethoprim (Hahn *et al.*, 2003), respectively and 125 – 500 µg/ml (80 – 320 mM) to oenothien B (Santos *et al.*, 2007). The values were chosen based on minimal inhibitory concentration (MIC) values described in the literature for *P. brasiliensis*. As controls media alone or media with DMSO was included. The inoculum size was determined by spectrophotometer, using yeast cells suspension in sterile 0,85% NaCl solution. The suspension was agitated to disperse the cells aggregate. The yeast cells were collected from the MMcM broth medium and counted in Neubauer chamber to be used in the study. The initial densities of the inoculums were of 10^5 cells/ml and an aliquot of 0.1 ml was added to 2.4 ml de MMcM broth medium added of the drug. *P. brasiliensis* was grown on this condition for seven days, at 36°C, under orbital agitation of 150 rpm. Daily readings were realized using spectrophotometer at 520 nm. To each reading the *P. brasiliensis* yeast cells suspension was agitated, in order to disperse the cells aggregate.

After determination of the MIC concentrations for all compounds, it was performed the sensitivity test on petri dishes. For those assays *P. brasiliensis* yeast cells were grown for 7 days in Fava-Netto medium (Fava-Netto, 1955). Then transferred to a new medium and grown for 16h. A total the 320 mM of oenothien B associated with amphotericin B (0.08 mM), itraconazole (0.6 mM), sulfametoxazole (40 mM) or the combination

sulfamethoxazole/trimethoprim (40 mM), were added, each combination separately, to the petri dishes containing medium. Control petri dishes without the compound were also processed. *P. brasiliensis* yeast cells grown in broth medium were seeded in the petri dishes in a cell serial dilution (10^8 cells/ml, 10^7 cells/ml and 10^6 cells/ml). The petri dishes were incubated at 36°C and monitoring during 5 days for cellular growth.

RNA isolation

P. brasiliensis yeast cell were cultured in MMcM broth medium or in MMcM broth medium added of 500 µg/ml (320 mM) of oenothain B, for 90 and 180 min. For RNA isolation, cells were harvested by centrifugation, washed in cold water and the RNA of cultures driver and tester were extracted with Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA quality was assessed by the use of the $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ ratio, and by visualization of RNA on 1.5% agarose gel electrophoresis. The RNAs were used to construct subtracted libraries and qRT-PCR experiments.

Subtractive hybridization and generation of subtracted libraries

Since has been an propable synergic effect among oenothain B and the drugs used to PCM treatment was realized the RDA methodology for identified the putative responses of the compound to the fungal *P. brasiliensis*.

Subtractive hybridization was performed as described by Pastorian *et al.* (2000). First-strand cDNA synthesis was performed with 1 µg total RNA obtained from cultures driver and tester, through the use of SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies). Three microliters of the first-strand cDNA was used as template to synthesize the second-strand of cDNA. The cDNA was prepared using the SMART PCR cDNA synthesis kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA). The resulting cDNAs

were digested with the restriction enzyme *Sau3AI* (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham Place, UK). Four cDNA subtracted libraries were constructed. The up-regulated cDNA libraries were constructed from cDNA obtained from *P. brasiliensis* yeast cells, grown for 90 and 180 min in MMcM medium as driver and of cDNA synthesized from RNA extracted from *P. brasiliensis* yeast cells grown for 90 and 180 min in MMcM medium added of 320 mM oenothien B as tester. The down regulated cDNA libraries were constructed from cDNA obtained from *P. brasiliensis* yeast cells, grown for 90 and 180 min in MMcM medium added of 320 mM oenothien B as driver and cDNA, synthesized from RNA extracted from *P. brasiliensis* yeast cells grown for 90 and 180 min in MMcM medium as tester. The resulting products were purified using GFX kit (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). The tester-digested cDNA, of 90 and 180 min, was linked to adapters (a 24-mer annealed to a 12-mer) and amplified by PCR. For the generation of the differential products, up- and down-regulated, tester and driver cDNA, of both conditions, were mixed, separately; the hybridization occurred at 67°C for 18 h and the amplification occurred by PCR using the 24-mer oligonucleotide (Dutra *et al.*, 2004). Two successive rounds of subtraction and amplification using hybridization tester-driver ratios 1:10 and 1:100 were performed. Adapters were changed between cross-hybridization, and different products were purified using the GFX kit. The adapters used for subtractive hybridizations are listed in Table 1.

After the second subtractive reaction, an aliquot of the final RDA products (DP2 fragments) was purified using GFX kit and cDNA pools were cloned directly into the pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, USA). *Escherichia coli* XL1 Blue competent cells were transformed with the ligation products. Selected colonies were picked and grown in deep-well plates. Plasmid DNA was prepared from clones using standard protocols. In order to generate the EST (expressed sequence tags) sequences, single-pass,

5'-end sequencing of cDNAs by standard fluorescence labeling dye-terminator protocols with T7 flanking vector primer was performed. Samples were loaded onto a MegaBACE 1000 DNA sequencer (GE Healthcare) for automated sequence analysis.

EST processing pipeline, annotation and differential products analysis

The ESTs sequences were processed using Phred (Ewing *et al.*, 1998) and Crossmatch (<http://www.genome.washington.edu/UWGC/analysisistools/Swat.cfm>) programs. It was considered to analysis the sequences with at least 75 nucleotides and Phred quality grater or equal to 20. ESTs were screened for vector sequences against the UniVec data. The ESTs assembly was performed using CAP3 program (Huang & Madan, 1999) to clustery and creation of contigs and singlets. All these tools were integrated in a specific pipeline (<http://www.lbm.icb.ufg.br/pipelineUFG/>). The filtered sequences were compared against the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) non-redundant (nr) database from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using Blast X program (Altschul *et al.*, 1997) and the nucleotide database from *P. brasiliensis* structural genome (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/). The database sequence matches were considered significant at E-values 10^{-10} .

The search for functional categories was performed by using the bioinformatics tool Blast2GO that joints in one application GO annotation based on similarity searches with statistical analysis and highlighted visualization on directed acyclic graph. (Conesa *et al.*, 2005). The annotation was performed by applying an annotation rule to the obtained ontology. The rule seeks to find the most specific annotations with a certain level of reliability. The Blast2GO annotation algorithm already took multiple parameters into account such as sequence similarity, BLAST HSP (highest scoring pair) length and e-values, the GO hierarchical structure and GO term evidence codes (Conesa *et al.*, 2005;

Gtz *et al.*, 2008). Gene Ontology (GO) (<http://www.geneontology.org>), and INTERPRO were used for domain and functional site searches. The Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS) (<http://mips.gsf.de/>), GO, and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (<http://www.genome.ad.jp/kegg>) (Kanehisa & Goto, 2000) were used to designate the functional categories, EC number and the metabolic pathways, respectively. Clusters were compared with sequences from databases using Blast X program.

Quantitative analysis of RNA transcripts by reverse transcription Real-Time PCR (qRT-PCR)

This assay was performed to confirm the RDA results and the reliability of our approaches. The total RNA of yeast cell from *P. brasiliensis* cultured in the presence and in the absence of oenothin B was obtained as previously described, in independent experiments from that used in RDA analysis. Total RNAs were reverse transcribed using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) and oligo (dT)₁₅ primer. The qRT-PCR analysis was performed on a StepOnePlus™ realtime PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA) in triplicate. The PCR thermal cycling was 40 cycles of 95°C for 15 s; 60°C for 1 min. The SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) was used as reaction mixture, added of 10 pmol of each specific primer and 40 ng of template cDNA, in a final volume of 25 µl. A melting curve analysis was performed to confirm a single PCR product. The data were normalized with the transcript encoding the protein tubulin amplified in each set of qRT-PCR experiments. A non-template control was also included. Relative expression levels of the genes of interest were calculated using the standard curve method for relative quantification (Bookout *et al.*, 2006). The specific, sense and antisense primers are listed in Table 1.

The genes of *P. brasiliensis* are's used by qRT-PCR were the following: betaine aldehyde dehydrogenase (*PbBADH*), glutamine synthetase (*PbGLN*), threolose phosphatase (*PbTPS*), histone deacetylase-RPD3 (*PbHDAC*), Gac1 (*PbGAC1*), Pal1 (*PbPAL*) and C-5 sterol desaturase-ERG 3 (*PbERG3*).

Results

Sensibility test on the plates

To evaluate the inhibitory effect of amphotericin B, itraconazole, sulfamethoxazole and a combination of the sulfamethoxazole/trimethoprim, *P. brasiliensis* yeast cells, strain *Pb01*, was grown in the presence of different concentrations of the antifungal drugs, separately. The assay was performed using concentrations of 0.08 – 5mM for amphotericin B, 0.4 – 6mM for itraconazole, 5 – 1260 mM for sulfamethoxazole 20 – 1200 mM for combination of the sulfamethoxazole/trimethoprim. The values were chosen based on MIC values described in the literature for *P. brasiliensis* (Hahn & Hamdan, 2000; Hahn *et al.*, 2003). For oenothien B the inhibitory effect was performed using concentrations from 80 – 320mM as described before (Santos *et al.*, 2007). The MIC values to amphotericin B, itraconazole, sulfamethoxazole, combination of the sulfamethoxazole/trimethoprim and oenothien B were 0.08mM, 0.6mM, 40mM, 40mM and 320mM, respectively (data not shown).

The interaction between oenothien B and the antifungal, above were evaluated using the concentration described above by performing the sensitivity test on petri dishes. The growth of *P. brasiliensis* yeast cells was evaluated after five days of incubation. The higher inhibition was found to oenothien B associated with combination of the

sulfamethoxazole/trimethoprim (70,9%) followed by amphotericin B (63,8%), itraconazole (50,3%), and sulfamethoxazole (40,9%), as shown in Figure 1.

Identification of *P. brasiliensis* genes with differential expression during exposure to oenothain B

To identify *P. brasiliensis* genes differentially regulated in the presence of oenothain B, we determined the transcriptional profile of *P. brasiliensis* exposed to 320mM of this compound for 90 and 180 min at 37°C. This concentration was chosen based on a previous report describing that the MIC of oenothain B for *P. brasiliensis* (*Pb* 01 isolate) was of 320mM (Santos *et al.*, 2007). Aiming to verify if oenothain B could affect cell viability, we exposed *P. brasiliensis* yeast cell at 320mM of oenothain B for 60, 90, 120, 180, 240 and 300 min at 37°C. Under these conditions, *P. brasiliensis* yeast cell retained approximately 70% viability (data not shown). And the times 90 and 180 min were chosen for libraries construction. The RDA technique was carried out with RNA obtained from yeast cell incubated for 90 and 180 min in the presence 320mM of oenothain B. The RDA experimental design included two conditions: (i) *P. brasiliensis* yeast cells exposed in MMcM medium with 320 mM oenothain B for 90 and 180 min; (ii) *P. brasiliensis* yeast cells grown in MMcM medium for 90 and 180 min. For the up regulated libraries construction, the first (i) condition was used as tester populations and the latter (ii) as driver population. However, for the down regulated libraries construction, the first (i) condition was used as driver populations and the latter (ii) as tester population. Subtractions were performed by incubating the driver and testers. Selection of the cDNAs was achieved by construction of subtracted libraries up and down-regulated in pGEM-T Easy, as described in materials and methods.

In total, 1028 clones were successfully sequenced. From these, 463 and 121 clones up and down-regulated, respectively, were obtained from yeast cells after incubation with oenothien B for 90 min; and 301 and 143 clones were up and down-regulated, respectively, were obtained from yeast cells after incubation with oenothien B for 180 min. The ESTs were processed using the tools Blast2GO program, which allowed us to annotate and to identify the different functional groups.

Expression profile of *P.brasiliensis* yeast cells after 90 min of exposure to oenothien B

For comparative analysis, the 463 genes up-regulated from yeast cells exposure for 90 min to oenothien B were grouped in 60 clusters, represented by 35 contigs and 25 singlets; The 121 genes down-regulated were grouped in 26 clusters corresponding to 15 contigs and 11 singlets. Using Blast2GO program to analyze the ESTs obtained was possible to observe that among up-regulated ESTs, 1% were related with cellular transport, 1% corresponded to transcripts involved in cell cycle and DNA processing, 2% functional unclassified proteins, 5% corresponded to energy, 8% were related to metabolism, 11% were related to protein fate, 26% corresponded to unclassified proteins and 46% of the transcripts corresponded to EST related to transcription (Figure 2A). Among the ESTs down-regulated, 1% of the ESTs corresponded to proteins involved with cell rescue, 3% corresponded to energy, 5% corresponded to cell growth, 13% were related to transporter, 13% corresponded to unclassified proteins, 16% of the transcripts corresponded to EST related to transcription, 22% corresponded to signal transducer and 27% were related to metabolism (Figure 2B).

The adaptations made by *P. brasiliensis* after treatment with oenothien B can be inferred by classifying the ESTs into seven groups of functionally related genes (Table 2). We analyzed the occurrence of the transcript by determining the number of ESTs founded

to each transcript. The greatest occurrence of cDNAs after oenothien B treatment for 90 min were as following for up-regulated ESTs: URG3 (154 ESTs), arginine N-methyltransferase *skb1* (52 ESTs), GATA-type sexual development transcription factor *NsdD* (22 ESTs), trehalose phosphatase (20 ESTs), transcription factor *steA* (18 ESTs), histone deacetylase *RPD3* (12 ESTs), glutamine synthetase (11 ESTs) and phosphatase regulatory subunit (*Gac1*) (10 ESTs). For down-regulated ESTs the greatest occurrence number to cDNAs were the following: betaine aldehyde dehydrogenase (29 ESTs), guanine-nucleotide-binding protein alpha-1 subunit (23 ESTs), C6 transcription factor (*Ctf1B*) (15 ESTs), , MFS transporter (15 ESTs).

Expression profile of *P.brasiliensis* yeast cells after 180 min of exposure to oenothien B

For comparative analysis, the 301 genes up-regulated from yeast cells exposure for 180 min to oenothien B were grouped in 33 clusters, represented by 20 contigs and 13 singlets; the 143 genes down-regulated were grouped in 19 clusters corresponding to 13 contigs and 6 singlets. Using Blast2GO program to analyze the 301 genes up-regulated, was possible observed that, 2% were related to protein fate, 2% to protein synthesis, 3% were related to metabolism, 5% of ESTs corresponded to biogenesis of cellular components, 24% to functional unclassified proteins, 25% corresponded to unclassified proteins, 39% of the transcripts corresponded to EST related to transcription (Figure 2C). Among the 143 genes down-regulated, 3% of the transcripts corresponded to EST related to transcription, 4% of the ESTs sequence similarity at encoding hypothetical proteins, 10% corresponded to cellular growth, 15% were related to transporter, 16% were related to metabolism, 21% of the ESTs would correspond to protein synthesis and 31% corresponded to transduction (Figure 2D).

The adaptations made by *P. brasiliensis* after treatment with oenothien B can be inferred by classifying the ESTs into seven groups of functionally related genes (Table 3). We analyzed the number occurrence of the transcript by determining the number of ESTs related to each transcript. The greatest number occurrence cDNAs appearing after oenothien treatment for 180 min were as following for up-regulated ESTs: transcription factor of fungi (65ESTs), C6 transcription factor (Ctf1B) (53 ESTs), Arp 2/3 complex subunit Arc16 (12 ESTs). For down-regulated ESTs the greatest number occurrence of cDNAs were the following: PAS (44 ESTs), MFS transporter (22 ESTs), CAP 20 – Pathogenesis associated protein (21 ESTs), betaine aldehyde dehydrogenase (16 ESTs), Mpv17/PMP22 (15 ESTs).

Confirmation of the expression of selected genes of *P. brasiliensis*

To further define gene response patterns and corroborate the RDA findings was qRT-PCR analysis was realized on independently generated RNAs of yeast cells recovered after incubation with oenothien B for how long. The expression of seven genes was investigated. The transcripts encoding *PbGLN*, *PbTPS*, *PbHDAC*, *PbGAC1* and *PbPAL* were up-regulated in *P. brasiliensis* exposed for 90 min to oenothien B. The transcript encoding *PbBADH*, *PbERG3* were down-regulated during 90 min of exposure to oenothien B. Figure 3 shows a representative profile of the qRT-PCR analysis, confirming the up and down-regulation of genes in the cited condition, as demonstrated in the subtracted cDNA libraries.

Adaptive response of *P. brasiliensis* to oenothien B

The most prominent adaptations undergone by *P. brasiliensis* during treatment with oenothien B are summarized in Figure 4. Some ESTs most important listed in Tables 2 and

3 indicate a possible strategy of *P. brasiliensis* to face the compound. Figure 4 shows a model of the adaptive changes of *P. brasiliensis* to the oenothien B. See section of discussion for details.

Discussion

Sensitivity test on the plate

The occurrence of fungal infections has increased dramatically, and frequently being associated with important morbidity and mortality, mainly in immunocompromised patients (Kauffman, 2006). Most of the opportunistic fungi show high resistance to conventional antifungal agents, even to the newest ones (; Gilgado *et al.*, 2006; Azor *et al.*, 2007; Marimón *et al.*, 2008). Combining available antifungal drugs with compound of different active mechanisms could be a promising therapeutic approach (Clemons & Stevens, 2006). The aim of antifungal combinations is not so much to broaden the spectrum or to avoid the development of resistance, but to increase efficacy by means of a potential synergistic effect and the compensation of possible pharmacokinetic defects (Candel *et al.*, 2008).

The classic drugs used for PCM are sulfonamides, amphotericin B and imidazolic derivate, such as ketoconazole, itraconazole and fluconazole (Ramos-e-Silva and Saraiva, 2008). Those drugs do not provide an effective remedy (Karen and Ernst, 2004), as resistant or multi-resistant strains have emerged (Hahn *et al.*, 2003) and the high toxicity of these drugs has further complicated the treatment of patients, mainly of the immunocompromised (Corti *et al.*, 2003). So, the association of oenothien B with these drugs was realized in order to observe the existence of a possible synergic effect between the compounds.

The mechanism of action of amphotericin B occurs through the formation of channel structures in the membrane, what causes release of cellular components, mainly potassium ions, and eventually leads to cell death (De Kruijff and Demel, 1974, De Kruijff *et al.*, 1974, Gale, 1974). Azoles (fluconazole, itraconazole, ketoconazole, and voriconazole) interact with the enzyme cytochrome P-450 14 α -sterol demethylase (ERG11), which is essential for the synthesis of ergosterol, by binding to the heme group located in the active enzyme (Kelly *et al.*, 1993; Sanglard, 2002). This inhibition causes depletion of ergosterol and accumulation of altered membrane sterol (Geogopapadakou & Walsh, 1996). Sulfonamides act as a competitive antagonist of *p*-aminobenzoic acid (PABA), which is an integral component of the structure of folic acid. The result of decreased folic acid synthesis is a decrease in nucleotides, with subsequent inhibition of growth (Zinner & Mayer, 2000). Trimethoprim-sulfamethoxazole act synergistically against *P. brasiliensis* (Restrepo & Arango, 1980; Stevens & Vo, 1982; Walzer *et al.*, 1992; Kunz *et al.*, 1995; Bartlett *et al.*, 1998).

Since the response of *P. brasiliensis* regarding oenoteína B were identified in the cell wall damage and transcripts involved in cell wall remodeling (Santos *et al.*, 2007) and osmotic stress, and also the growth of yeast cells of the fungus was reduced when the compounds currently used in PCM treatment (amphotericin B, itraconazole, sulfamethoxazole and to combination sulfamethoxazole/trimethoprim) were associated, can be inferred that there was a synergistic effect between the substances probably due to different mechanisms of action of compounds.

Effects of oenothien B on the mRNA expression of *P. brasiliensis*

According to the results obtained in the experiments of the sensitivity test on plates, we observed a possible synergic effect between oenoteína B and antifungal agents used in

the treatment of PCM, so the technique of RDA was performed in order to identify the genes are involved in the likely response of the compound to the fungus *P. brasiliensis*.

By subtractive hybridization of genes in the presence of oenothien B, we identified 463 and 301 ESTs up-regulated and 121 and 143 ESTs down-regulated, after 90 and 180 min of exposition to compound, respectively. A directed analysis of the modulated genes identified through our ESTs libraries allowed us to detect several genes up or down regulated involved in a wide range of cellular processes. This modulation is likely implicated with the *P. brasiliensis* adaptation to the presence of oenothien B.

The table 2 list up and down-regulated genes in *P. brasiliensis* after 90 min of exposition to oenothien B, which were classified in different functional categories, in agreement with MIPS. Among the genes involved in the wall cell metabolism -1,6-mannosyltransferase was identified. These molecules have many functions, including participation in the structures proteins, maintenance of the cell wall and membrane, synthesis of the extracellular matrix, storage of the nutrients, and ligand for cell-cell interaction (Dwek, 1996). The polysaccharide network is uniformly distributed all around the cell and is essential for cell integrity (Uccelletti *et al.*, 2006).

The glutamine synthetase gene expression also was up-regulated in *P. brasiliensis*, in the presence of oenothien B. Glutamine synthetase catalyses the synthesis of glutamine from glutamate and ammonia (Shapiro & Stadtman, 1970). In *Saccharomyces cerevisiae* the mutation of glutamine synthetase caused a reduction of the chitin content, causing defects in the cell wall (Shimizu *et al.*, 1997). In previous studies realized with *P. brasiliensis*, the synthesis of chitin was related to increase transcription of glutamine synthetase in the deposition chitin in response the changes in external osmolarity faced by the fungus (Bailão *et al.*, 2006).

The ergosterol is one of the most important components in fungal membranes (Bard *et al.*, 1993). It and its biosynthetic pathway are essential for fungal growth (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008). Previous studies have shown that oenothain B exposure resulted in damage of the cell cytoplasmic membrane (Santos *et al.* 2007) corroborating with the down-regulation of C-5sterol desaturase (ERG3) enzyme involved with the ergosterol pathway, of *P. brasiliensis* in the presence of oenothain B.

Some transcription factors were found down-regulated in *P. brasiliensis* after exposure to oenothain B. Proteins containing PAS domains are located in the cytosol, and therefore they detect internal signals, but they can be also sense for to environmental factors that cross the cell membrane (Taylor & Zhulin, 1999), suggesting that the fungal is responding to compound.

Genes involved in multidrug resistance, such as MFS and ABC-transporter were differentially expressed in response to oenothain B treatment. Pal 1, protein involved with cell morphology and lipid/fatty acid transport (Ge *et al.*, 2005), was up-regulated while the MFS transporter was down-regulated (Jeon, *et al.*, 2009) in *P. brasiliensis* in the presence of oenothain B.

Table 3 lists up and down-regulated genes in *P. brasiliensis* after 180 min of exposition to oenothain B. Up and down-regulated genes belonging to different functional categories were identified.

Genes involved in the cell wall biosynthesis, as the protein KRE6, were also up-regulated after 180 min of exposure for oenothain B. KRE and KRE-related genes have been isolated as genes that are required for full levels of cell wall 1,6-glucan and which, when nonfunctional, confer resistance to K1 killer toxin (Orlean, 1997). As several of the corresponding proteins have been localized in the endoplasmatic reticulum (Kre5 and Cwh41), in the Golgi complex (Kre6 and possibly also its homolog Skn1), and at the cell

surface (Kre1 and Kre9), it has been proposed that they might be involved in sequential steps of the biosynthesis of 1,6-glucan to cell wall (Boone, 1990; Montijn *et al.*, 1994; Klis, 1994; Orlean, 1997). In *S. cerevisiae*, the disruption of KRE6 reduced 1,6-glucan levels to half of that measured from wild-type cells (Roemer & Bussey, 1991). The 1,6-glucan and the genes involved in its synthesis are critical for maintaining growth, morphology and cell wall integrity in *C. neoformans* (Gilbert *et al.*, 2010). As observed after 90 min of exposure to oenothien B, glutamine synthetase continued up-regulated in *P. brasiliensis* after 180 min. The presence of these two genes involved in the cell wall biosyntheses indicate that the fungus continues remodeling the cell wall probably due to the damage caused by oenothien B.

The subunit 16-Arc of the Arp2/3 complex was found up-regulated in *P. brasiliensis* after 180 min exposed to oenothien B. Arp (actin-related protein)3 2/3 complex nucleates actin filaments as branches on pre-existing actin filaments so that growth of these filaments can transmit force for cellular motility through the cytoskeleton (Pollard, 2007). Dynamic rearrangements of the actin cytoskeleton are essential for cellular responses to the environment (Pollard *et al.*, 2000). Actin nucleation by the Arp2/3 complex is critical for initial steps of newly formed endocytic vesicle movement. In addition, this complex is involved in intracellular organelle (e.g., mitochondria) transport (Boldogh *et al.*, 2003; Fehrenbacher *et al.*, 2004).

Among the down-regulated genes found after 180 min of incubation of yeast cell *P. brasiliensis* with oenothien B, transcripts associated with pathogenesis were observed, as the CAP20. In *Colletotrichum gloeosporioides*, both RNA and CAP20 protein accumulated during formation of the appressoria and whose removal determines a marked reduction in virulence (Hwang *et al.* 1995).

Genes involved in multidrug resistance, as MFS membrane protein transporters, transcription factors, PAS domain and the transcript Mpv17, also were down regulated. Mpv17 of *S. cerevisiae* is homolog to peroxisomal membrane protein Pmp22 and has been also localized to the peroxisomal membrane of mammalian cells (Trott & Morano, 2004).

For further confirmatory data about the expression level of ESTs found with subtractive libraries, assessment of *P. brasiliensis* *PbBADH*, *PbGLN*, *PbTPS*, *PbHDAC*, *PbGAC1*, *PbPAL* and *PbERG3* was provided by qRT-PCR analysis. *PbGLN*, *PbTPS*, *PbHDAC*, *PbGAC1* and *PbPAL* were confirmed to be up-regulated, *PbBADH* and *PbERG3* were confirmed to be down-regulated in yeast cells of *P. brasiliensis* after 90 min of exposure at oenothien B, confirming our findings by RDA experiments.

Adaptive response of *P. brasiliensis* to oenothien B

The knowledge of ESTs up- and down-regulated in *P. brasiliensis* after growing in the presence of oenothien B enable the elaboration of a putative model of adaptive response of *P. brasiliensis* to this compound.

The transcription factors *atf1*, *prp1* and *RPD3*, up-regulated in *Schizosaccharomyces pombe* under osmotic stress conditions (Yamamoto *et al.*, 2003), could induce the transcription of α -1,6-mannosyltransferase (Sertil *et al.*, 2007). In this way, α -1,6-mannosyltransferase, could synthesize mannoproteins present on the cell wall (Uccelletti *et al.*, 2006). Alanine glyoxylate aminotransferase that converts alanine to pyruvate (Takada *et al.*, 1985) and urease that produces NH_3 (Mobley & Hausinger, 1989) used by glutamine synthase to produce glutamine (Magasanik, 1992) could carry the production of chitin in the cell wall (Ram *et al.*, 2004). Similarly, the protein KRE, that is associated with the biosynthesis of α -1,6-glucan from of the Golgi apparatus (Orlean, 1997), could carry the production of α -1,6-glucan to repair of the cell wall. Mannoproteins, α -1,6-glucan and

chitin are required to maintenance of the cell wall and therefore to the cell viability. Since oenothien B interferes with the cell wall viability causing damage on cell surface of *P. brasiliensis* (Santos *et al.*, 2007), genes involved on synthesis of mannoproteins, -1,6-glucan and chitin could be inducing the repair of the cell wall in order to survive in this condition.

Hexokinase converts glucose to glucose 6P (Kuser *et al.*, 2000) that is precursor of trehalose 6P, which by action of trehalose phosphatase produces trehalose (Iordachescu & Imai, 2008). The accumulation of this sugar provides protection against damage caused by stress (Elbein *et al.*, 2003).

Acyl-CoA dehydrogenase could produce acetyl-CoA that could produce long-chain-fatty acids by action of fatty acid elongase GNS1/SUR4 (Baudry *et al.*, 2001). These fatty acids could be transported by PAL1, a protein that acts on cell morphology (Ge *et al.*, 2005).

In this way, the presence of oenothien B seems to induce a mechanism of response similar to osmotic stress and biosynthesis of membrane and cell wall of *P. brasiliensis*.

Acknowledgments

This work at Universidade Federal de Goiás was supported by International Foundation for Sciences (IFS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and by Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). P.F.Z.C. was supported by a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

Alcazar-Fuoli LA, Mellado E, Garcia-Efreona G, Lopez B JL, Grimalt JO, Cuenca-Estrella JM, Rodriguez-Tudela JL, 2008. Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Steroids* 73: 339–347.

Alice CB, Vargas VMF, Silva GAAB 1991. Screening of plants used in South Brazilian folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 35:165-171.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Miller W, Lipman DJ 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 25: 3389-402.

Amat AG, Yajía ME 1991. Medicinal plants and ethnopharmacology in the province of Misiones (Argentina). *Acta Farmacêutica Bonaerense*. 10:153-159.

Aoki K, Maruta H, Uchiumi F, Hatano T, Yoshida T and Tanuma S 1995. A Macrocircular Ellagitannin, Oenothin B, Suppresses Mouse Mammary Tumor Gene Expression via Inhibition of Poly (ADP-ribose) Glycohydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Communications*. 210: 329-337.

Azor M, Gene J, Cano J, Guarro J. 2007. Universal in vitro antifungal resistance of genetic clades of the *Fusarium solani* species complex. *Antimicrob Agents Chemother*. 51:1500 – 3.

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

Bandoni AL, Mendiondo ME, Rondina RVD, Coussio JD 1972. Survey of Argentine medicinal plants. I. Folklore and phytochemical screening. *Lloydia*. 35:69-80.

Bard M, Lees ND, Turi T, Craft D, Cofrin L, Barbuch, R 1993. Sterol synthesis and viability of *erg11* (cytochrome P450 lanosterol demethylase) mutations in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Lipids*. 28: 963–967.

Bartlett MS, Shaw MM, Smith JW, Meshnick SR 1998. Efficacy of sulfamethoxypyridazine in a murine model of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Antimicrob. Agents Chemother*. 42:934–935.

Baudry K, Swain E, Rahier A, Germann M, Batta A, Rondet S, MAandalai S, Henry K, Tint GS, Edlinf T, Kurtzi M, Nickels JT 2005. The Effect of the *erg26-1* Mutation on the Regulation of Lipid Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem*. 276: 12702-12711.

Boldogh IR, Nowakowski DW, Yang HC, Chung H, Karmon S, Royes P, Pon LA 2003. A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial

membranes and DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery. *Mol. Biol. Cell* 14: 4618–4627.

Boone CSS, Sommer AH, Bussey H 1990. Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall β -glucan assembly. *J. Cell Biol.* 110: 1833–1843.

Bookout L, Cummins CL, Mangelsdorf DJ, Pesola JM, Kramer MF 2006. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR, in: F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl (Eds), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, pp.15.8.1 e 15..8.28.

Brummer E, Castañeda E, Restrepo A 1993. Paracoccidioidomycose: an Update. *Microbiol Rev.* 6: 89-117

Candel FJ, Matesanz M, Mensac J 2008. Sequential prescription of antifungals in invasive fungal infection: the importance of mechanism of action. *International Journal of Antimicrobial Agents* 32:S133–S135.

Clemons KV, Stevens DA 2006. Animal models testing monotherapy versus combination antifungal therapy: lessons learned and future directions. *Curr Opin Infect Dis.* 19:360–4.

Coelho de Souza G, Haas APS, Von Poser GL, Schapoval EES, Elisabetsky E 2004. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J Ethnopharm.* 90:135-143.

Conesa A, Göts S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research, *Bioinformatics*. 21: 3676-6.

Corti M, Palmieri O, Negroni R, Soto I, Villafane MF 2003. Peripleutis due to *Paracoccidioides brasiliensis* in a patient with AIDS. *Medicina*. 63:417.

Dasgupta A Bernard, DW 2006. Herbal Remedies: Effects on clinical laboratory tests. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 130.

Da Silva Neto BR, de Fatima da Silva J, Mendes-Giannini MJ, Lenzi HL, de Almeida Soares CM, Pereira M, 2009. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. *BMC Microbiol*. 9: 272.

De Kruijff B, Demel, RA 1974. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of acholeplasma laidlawii cells and lecithin liposomes. III. Molecular structure of the polyene antibioticcholesterol complexes. *Biochim. Biophys. Acta*. 339, 57-70.

De Kruijff B, Gerritsen W, Oerlemans A, Demel RA, Van Deenen LLM 1974. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of acholeplasma laidlawii cells and lecithin liposomes. Specificity of the membrane permeability changes induced by the polyene antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta*. 339: 30-43.

Dutra V, Nakazato L, Broetto IS, Schrank MH, Vainstein A, Schrank. 2004. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium*

anisopliae during the infection process of the *Boophilus microplus* cuticle. *Res. Microbiol.* 155: 245-251.

Dwek RA 1996. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chem Rev.* 96(2):683-720.

Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13:17R–27R.

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P 1998. Base-calling of automated sequencer traces using PHRED. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8:175-185.

Fava-Netto C. 1955. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na Blastomicose Sul-Americana com antígenos polissacarídicos. *Arquivos de Cirurgia Clínica Experimental.* 18: 197-254.

Fehrenbacher KL, Yang HC, Gay AC, Huckaba TM, Pon LA 2004. Live cell imaging of mitochondrial movement along actin cables in budding yeast. *Curr. Biol.* 14: 1996–2004.

Freshney R 1987. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, p. 117, Alan R. Liss, Inc., New York.

Funatogawa K, Hayashi S, Shimomura H, Yashida T, Hatano T, Ito H, Hirai Y 2004. Antibacterial Activity of Hydrolyzable Tannins Derived from Medicinal Plants against *Helicobacter pilory*. *Microbiol Immunol.* 48: 251-261.

Gale EF 1974. The release of potassium ions from *Candida albicans* in the presence of polyene antibiotics. *J. Gen. Microbiol.* 80:451-465.

Ge W, Chew TG, Wachtler V, Naqvi, SN, Balasubramanian MK 2005. The Novel Fission Yeast Protein Pal1p Interacts with Hip1-related Sla2p/End4p and Is Involved in Cellular Morphogenesis. *Mol. Biol. Cell.* 16:4124-4138.

Georgopapadakou NH, Walsh TJ 1996. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2:279-91.

Gilbert NM, Donlin MJ, Gerik KJ, Specht CA, Djordjevic JT, Wilson CF, Sorrell C, Lodge JK 2010. KRE genes are required for b-1,6-glucan synthesis, maintenance of capsule architecture and cell wall protein anchoring in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology.* 76(2):517–534.

Gilgado F, Serena C, Cano J, Gene J, Guarro J 2006. Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:4211–3.

Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, Robles M, Talón M, Dopazo J, Conesa A 2008. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite, *Nucleic Acids Res.* 36: 3420-35.

Hahn RC, Hamdan JS 2000. In vitro susceptibilities of *P. brasiliensis* yeast form to antifungal drugs. *Mycoses.* 43:403-407.

Hahn RC, Morato Conceição YT, Santos NL, Ferreira JF, Hamdan JS 2003. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and *in vitro* resistance to ketoconazole e trimethoprim sulphamethoxazole. *Mycoses*. 46: 403-407

Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Filho BPD 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97:1027-1031.

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

Hwang CS, Flaishman MA, Kolattukudy PE 1995. Cloning of a Gene expressed during appressorium formation by *colletotrichum gloeosporioides* and a marked decrease in virulence by disruption of this gene. *Plant Cell*, 7: 183-193.

Iordachescu M, Imai R 2008. Trehalose Biosynthesis in Response to Abiotic Stresses. *J Integ Plant Biol* 50 (10): 1223–1229.

Jeon J, Yang JE, Kim S 2009. Integration of Evolutionary Features for the Identification of Functionally Important Residues in Major Facilitator Superfamily Transporters. *PLOS Computational Biology*.

Karen WM, Ernst E 2004. Herbal medicines for treatment of fungal infections: a systematic review of controlled clinical trials. *Mycoses*. 47:87-92.

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

Kauffman CA 2006. Fungal infections. *Proc Am Thorac Soc.* 3:35–40.

Kelly SL, Arnoldi A, Kelly DE 1993. Molecular genetic analysis of azole antifungal mode of action. *Biochemical Society transactions.* 21:1034-1038.

Klis FM 1994. Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast.* 10:851–869.

Kunz S, Junker U, Blaser J, Joos B, Meyer B, Zak O, O'Reilly T 1995. The scid mouse as an experimental model for the evaluation of anti-*Pneumocystis carinii* therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 36:137–155.

Kuser PR, Krauchenco S, Antunes OAC, Polikarpov I 2000. The High Resolution Crystal Structure of Yeast Hexokinase PII with the Correct Primary Sequence Provides New Insights into Its Mechanism of Action. *J. Biol. Chem.* 275:20814–20821.

Lesuisse D, Berjonneau J, Ciot C, Devaux P, Doucet B, Gouvest JF, Khemis B, Lang C, Legrand R, Lowinski M, Maquin P, Parent A, Schoot B, Teutsch G. 1996. Determination of Oenothien B as active 5- α -reductase-inhibiting principle of the folk medicine *Epilobium parviflorum*. *Journal Natural Products.* 59: 490-492.

Magasanik B 1992. The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Gene Expression, In: Jones, E., W.; Pringle, J., R.; Broach, J., R.(Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1992, pp. 283e317.

Marimón R, Serena C, Gené J, Cano J, Guarro J 2008. In vitro antifungal susceptibilities of 5 species of *Sporothrix*. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:732–4.

Miyamoto K, Kishi, N, Koshiura, R, Yoshida, T, Hatano, T, Okuda, T 1987. Relationship between the structures and the antitumor activities of tannins. *Chem. Pharm. Bull.* 35:814-822.

Mobley HLT, Hausinger RP 1989. Microbial Ureases: Significance, Regulation, and Molecular Characterization. *Microbiol. Rev.* 53:85-108.

Montijn RC, Van Rinsum J, Van Schagen FA, Klis FM 1994. Glucomannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side chain. *J. Biol. Chem.* 269: 19338–19342.

National Committee For Clinical Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard, 2nd ed. M27-A2. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.39.

Orlean P 1997. Biogenesis of yeast cell wall and surface components, p. 229–362. In J. R. Pringle, J. R. Broach, and E. W. Jones (ed.), *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*, vol 3. Cell cycle and cell biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Pastorian K, Havell III L, Byus CV 2000. Optimization of cDNA Representational Difference Analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. *Anal Biochem.* 283:89-98

Pereira M, Felipe MSS, Brígido MM, Soares CMA, Azevedo MO 2000. Molecular cloning and characterization of a glucan synthase gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast.* 16:451-462.

Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD 2000. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 545–576.

Pollard TD 2007. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36: 451–477.

Ram AF, Arentshorst M, Damueld RA, VanKuyk PA, Klis FM, van den Hondel CAMJJ 2004. The cell wall stress response in *Aspergillus niger* involves increased expression of the glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase-encoding gene (*gfaA*) and increased deposition of chitin in the cell wall. *Microbiology.* 150:3315-3326.

Ramos-e-Silva MD, Saraiva LES 2008. Paracoccidioidomycosis. *Dermatol Clin.* 26:257-269.

Restrepo A, Mc Eween, JG, Castaneda, E 2001. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med. Mycol.* 39: 233-241.

Restrepo A, Jiménez B 1980. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *Journal of Clinical Microbiology*. 12: 279-281.

Restrepo A, and Arango MD 1980. In vitro susceptibility testing of *Paracoccidioides brasiliensis* to sulfonamides. *Antimicrob. Agents Chemother*. 18:190–194.

Roemer T and Bussey H 1991. Yeast beta-glucan synthesis: *KRE6* encodes a predicted type II membrane protein required for glucan synthesis *in vivo* and for glucan synthase activity *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11295–11299.

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

Sanglard, D 2002. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Current Opinion Microbiology*. 5:379-385.

Santos GD, Ferri PH, Santos SC, Bao SN, Soares CMA, Pereira M 2007. Oenothin B inhibits the expression of PbFKS1 transcript and induces morphological changes in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 45(7):609-618.

Septímio LR 1994. A fitoterapia baseada em ervas medicinais do Cerrado. SIPE, Ministério da Cultura, Brasília.

Sertil O, Vemula A, Salmon SL, Morse RH, Lowry CV 2007. Direct role for the Rpd3 complex in transcriptional induction of the anaerobic DAN/TIR genes in yeast. *Mol Cell Biol.* 27:2037-2047.

Shapiro BM, Stadtman ER 1970 Glutamine synthetase (*E. coli*). *Meth Enzymol* 17A: 910–922.

Shimizu J, Okumura Y, Yoda K, Yamasaki M 1997. Glutamine synthetase mutant of shows defect in *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Gen. App. Microbiol.*, 43:157-162.

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

Souza LKH, Oliveira, CMA, Ferri PH *et al* 2002. Antifungal properties of Brazilian Cerrado plants. *Braz J Microb.* 33:247-249.

Stevens DA, Vo PT 1982. Synergistic interaction of trimethoprim and sulfamethoxazole on *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21:852–854.

Takada Y, Noguchi T 1985. Characteristics of alanine: glyoxylate aminotransferase from *Saccharomyces cerevisiae*, a regulatory enzyme in the glyoxylate pathway of glycine and serine biosynthesis from tricarboxylic acid cycle. *J. Biochem.* 231:157-163.

Taylor BL, Zhulin IB 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63: 479–506.

Trott A, Morano KA 2004. Is the Stress-Induced *Saccharomyces cerevisiae* Ortholog of the Mammalian Kidney Disease Gene *Mpv17* and Is Required for Ethanol Metabolism and Tolerance during Heat Shock. *Eukaryotic Cell*. 3(3):620-631.

Uccelletti D, Farina F, Rufini S, Magnelli P, Abeijon C, Palleschi C 2006. The *Kluyveromyces lactis* -1,6-mannosyltransferase KIOch1p is required for cell-wall organization and proper functioning of the secretory pathway *FEMS Yeast* 6:449–457.

Walzer PD, Foy J, Steele P, Kim CK, White M, Klein RS, Otter BA, Allegra C 1992. Activities of antifolate, antiviral, and other drugs in an immunosuppressed rat model of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Antimicrob. Agents Chemother*. 36:1935–1942.

Yamamoto K, Okamoto M, Yoko-o T, Jigami Y 2003. Salt stress induces the expression of *Schizosaccharomyces pombe och1⁺*, which encodes an initiation-specific -1,6-mannosyltransferase for *N*-linked outer chain synthesis of cell wall mannoproteins. *Biosci Biotechnol Biochem*. 67(4):927-929.

Zambuzzi-Carvalh, PF, Cruz, AHS, Silva, LKS, Goes, A, Soares, CMA, Pereira, M 2009. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 is required in the glyoxylate cycle and in the allantoin degradation pathway. *Med Myc* 31:1-11.

Zinner S, Mayer K 2000. Sulfonamides and trimethoprim, p. 394–401. *In* G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin (ed.), *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases*, 5th ed., vol. 1. Churchill Livingstone, Philadelphia, Pa.

Figures legends:

Figure 1 - Sensitivity test plate. *P. brasiliensis* yeast cells were growth in the presence of oenothien B (320mM) and of antifungal agents, amphotericin B (0.08mM), itraconazole (0.6mM), sulfamethoxazole (40mM) and combination of sulfamethoxazole/trimethoprim (40mM).

Figure 2 - Functional classification of *P. brasiliensis* cDNAs derived from RDA experiments. (A) up-regulated genes obtained from cDNAs synthetized from RNAs of yeast cells exposure to oenothien B for 90 min. (B) down-regulated genes obtained from cDNAs synthetized from RNAs of yeast cells exposure to oenothien B for 90 min. (C) up-regulated genes obtained from cDNAs synthetized from RNAs of yeast cells exposure to oenothien B for 180 min. (D) down-regulated genes obtained from cDNAs synthetized from RNAs of yeast cells exposure to oenothien B for 180 min. The percentage of each functional category is shown (refer to Table 2 and Table 3). Functional classification was based on BLASTX homology of each EST against the GenBank non-redundant database at a significant homology cut-off $1e-05$ and the MIPS functional annotation scheme. Each functional class is represented as a segment and expressed as a percentage of the total number of ESTs in each library.

Figure 3 - Average of gene expression of *PbBADH*, *PbGLN*, *PbTPS*, *PbHDAC*, *PbGAC1*, *PbPAL* and *PbERG3* as determined by quantitative real time qRT-PCR. qRT-PCR plot of *PbGLN*, *PbTPS*, *PbHDAC*, *PbGAC* and *PbPAL* up-regulation levels of *P. brasiliensis* yeast cells after 90 min of exposure to oenothien B. qRT-PCR plot of *PbBADH* an *PbERG3* down-regulation levels of *P. brasiliensis* yeast cells after 90 min of

exposure to oenothien B. The values of genes were standardized using the values of expression of the constitutive gene encoding to the protein tubulin. The expression level was calculated by relative standard curve method. The standard deviations are presented from three independent experiments. *Significantly increased expression ($P < 0.05$).

Figure 4 - Distribution of genes responding to oenothien B in *P. brasiliensis*. Data are shown for a subset of genes that were significantly induced or repressed. Data were organized into various biological process using Functional Categories MIPS and GO tools. GO terms shown are those that were considered significantly over expressed by the analyses. The term “cell wall/membrane organization was including separately to highlight additional genes that are relevant to the biological response to oenothien B. Signals in parentheses represent average change in gene expression. Positive signal indicate induction, and negative values indicate repression. A complete list of all significant genes can be found in Tables 2 and 3.

Figure 1

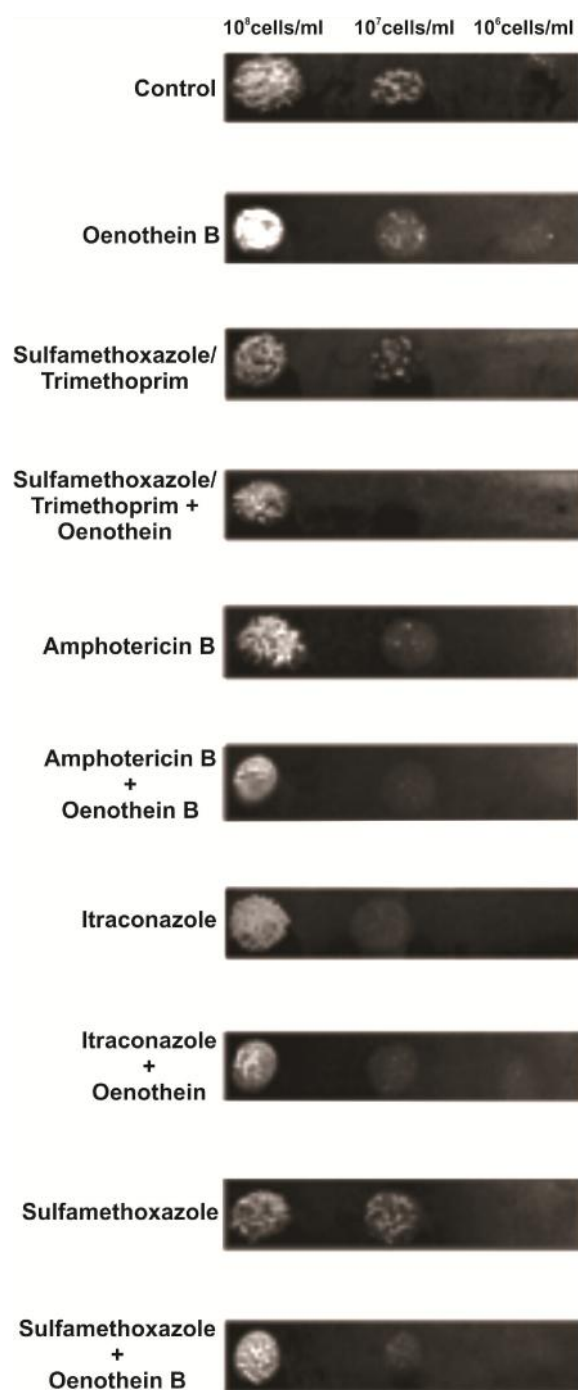


Figure 2

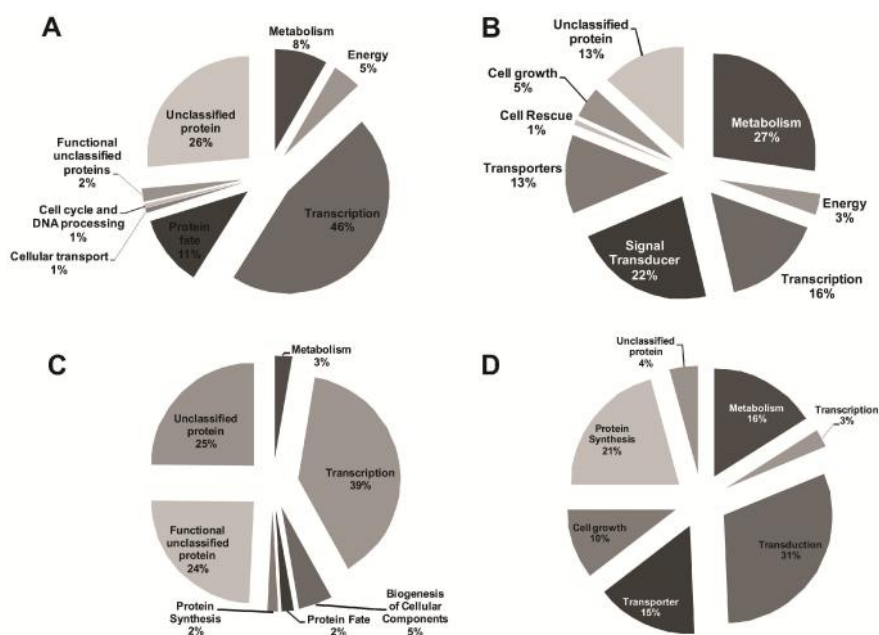


Figure 3

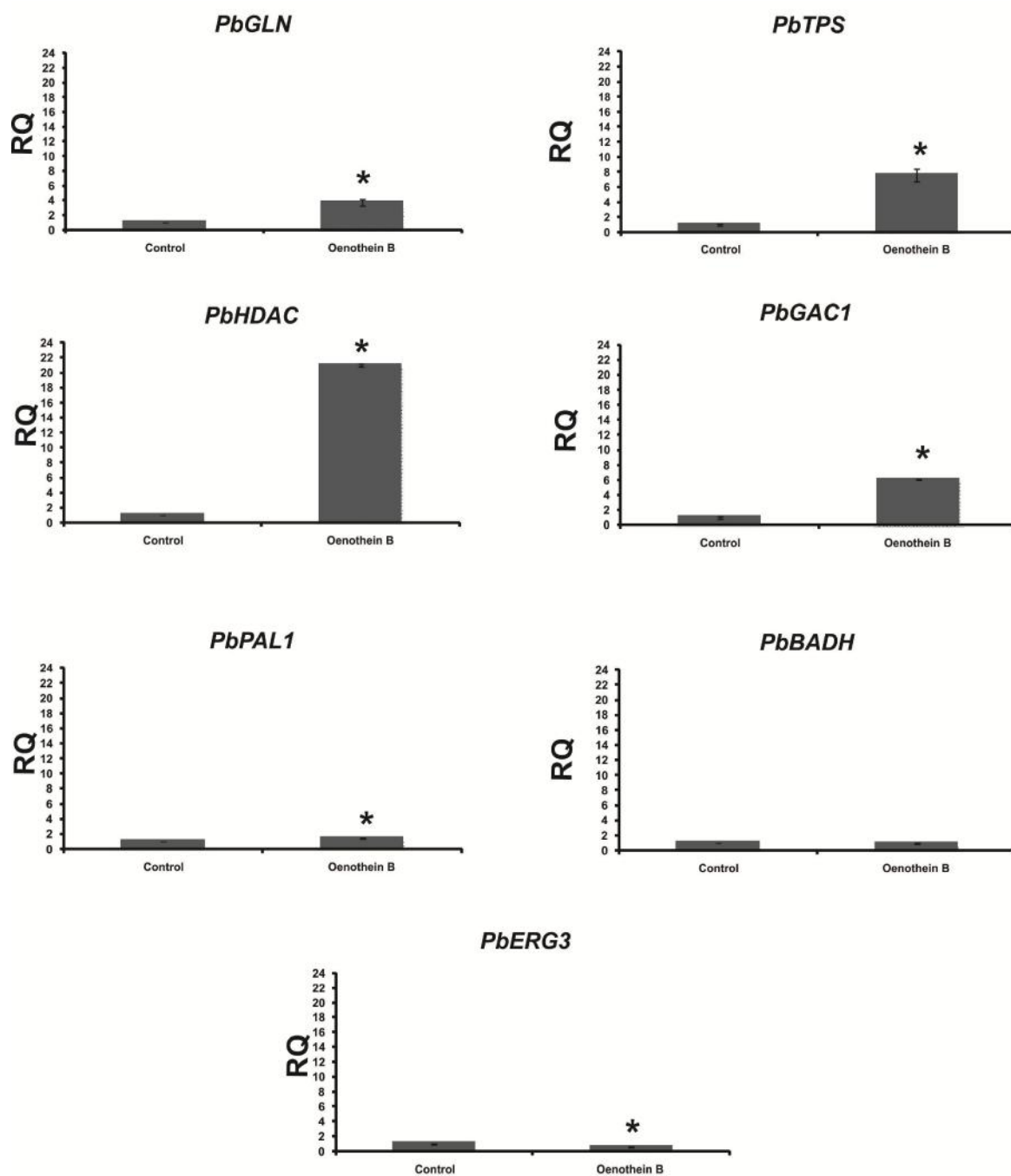


Figure 4

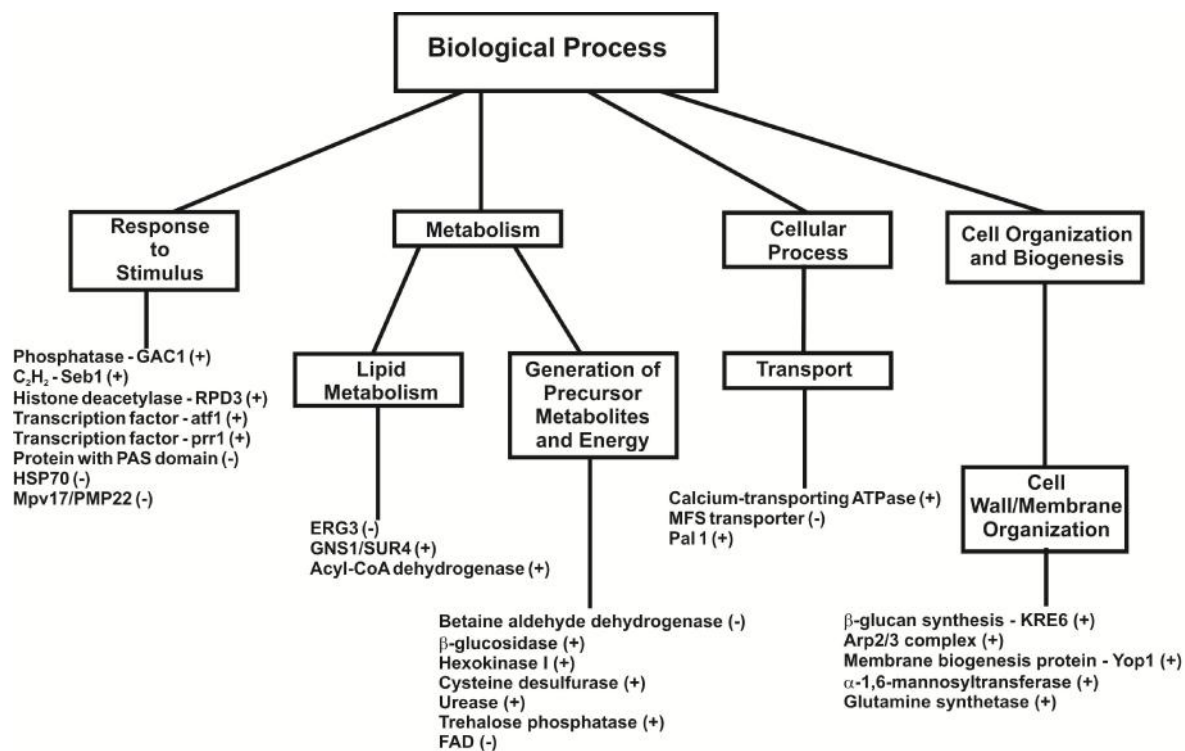


Table 1 - Oligonucleotides used during the work.

Oligonucleotides	Sequences	Reaction
cDNA	5' AGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG 3'	Synthesis of the first-strand
CDS	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT(30)N1N 3'	Synthesis of the first-strand
PCRII	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT 3'	Synthesis of the second-strand
RBam12	5' GATCCTCGGTGA 3'	Adapter 1 (RDA)
RBam24	5' AGCACTCTCCAGCCTCTCTCACCGAG 3'	Adapter 1 (RDA)
JBam12	5' GATCCGTTTCATG 3'	Adapter 2 (RDA)
JBam24	5' ACCGACGTCGACTATCCATGAACG 3'	Adapter 2 (RDA)
NBam12	5' GATCCTCCCTCG 3'	Adapter 3 (RDA)
NBam24	5' AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG 3'	Adapter 3 (RDA)
T7	5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'	Sequencing
BetS	5' GTTGAAGAGCCATTTGGTCC 3'	Real Time PCR
BetAS	5' CAGATCATTGGACCACACAGA 3'	Real Time PCR
GlutS	5' CGATCAAAAACAAAGACCCT 3'	Real Time PCR
GlutAS	5' GGTCTGGGTACATGGCAAC 3'	Real Time PCR
TreS	5' AGTGGCAAGACAAGGTGGTT 3'	Real Time PCR
TreAS	5' CAACGCAATATACTGAGGGA 3'	Real Time PCR
HisS	5' TGGCTTCTGCTATGTAAATGAT 3'	Real Time PCR
HisAS	5' AGGCTTCTTCCACTCCATCT 3'	Real Time PCR
GacS	5' AGTACTGCTTCTATGGATCTTC 3'	Real Time PCR
GacAS	5' ACTATTTCCCTGGGGTGGTTG 3'	Real Time PCR
PalS	5' TGCTGCGGAACCTTTTGAA 3'	Real Time PCR
PalAS	5' GGGCTTATCGTCGGAGAGTC 3'	Real Time PCR
ERG3 sense	5' CACTTGGATCTTCGGCCTAAT 3'	Real Time PCR
ERG3 anti-sense	5' TGCATAGCCACGGACTTCGA 3'	Real Time PCR

Table 2: Annotated ESTs up and down-regulated genes of yeast cells after exposure at oenothain B for 90 min versus control yeast cells.

<i>Functional category</i>	<i>Gene product</i>	<i>Function</i>	<i>e-value with genes P. brasiliensis 01/Acession number^a</i>	<i>Occurrence number up-regulated genes</i>	<i>Occurrence number down-regulated genes</i>
Metabolism	Alanine-glyoxylate aminotransferase	Metabolic process of the glyoxylate; Serine-pyruvate transaminase activity	1.0E-37/PAAG03138.1	2	_____
	Alpha 1,6 mannosyltransferase	Transferring hexosyl groups	1.0E-69/ PAAG01658.1	5	_____
	Betaine aldehyde dehydrogenase	Oxidation reduction, betaine biosynthetic procedd, betaine aldehyde dehydrogenase activity, amino acid metabolis	1.0E-42/PAAG05392.1	_____	29
	Beta-glucosidase (Glycosyl hydrolase)	Sugar, glucoside, polyol and carboxylate metabolism	1.0E-91/PAAG04545.1	1	_____
	Cysteine desulfurase	Biosyntheses of Fe-S clusters, thiamine, thionucleosides in tRNA, biotin, lipoic acid and NAD	1.0E-56/ PAAG05850.1	4	_____
	C-5 sterol desaturase (ERG-3)	Steroid biosynthetic process; Lipid metabolism	1.0E-41/PAAG03651.1	_____	4
	Fatty acid elongase GNS1/SUR4	Fatty acid and isoprenoid metabolism; Members of this family are involved in long chain fatty acid elongation systems that produce the 26-carbon precursors for ceramide and sphingolipid synthesis	1.0E-70/PAAG08553.1	2	_____
	Glutamine synthetase	Metabolism of nitrogen by catalyzing the condensation of glutamate and ammonia to form glutamine, precursor of the chitin synthesis	1.0E-89/ PAAG07003.1	11	_____
	Hexokinase-1	C-compound and carbohydrate metabolism; regulation of glycolysis and gluconeogenesis	0.0/ PAAG01377.1	2	_____
NADP-dependent	15-oxoprostaglandin 13-oxidase activity; Metabolic	1.0E-19/PAAG05416.1	1	_____	98

	leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase	process				
	Urease	Urea metabolic process, nickel ion binding	1.0E-59/PAAG00954.1	1	_____	
	Phosphatase regulatory subunit (Gac1)	Temperature perception and response	1.0E-97/PAAG00128.1	10	_____	
Energy	Acyl-CoA dehydrogenase	Catalyse the first step in each cycle of beta-oxidation in mitochondrion. Oxidation reduction	1.0E-33/PAAG05211.1	1	_____	
	Succinate/fumarate mitochondrial transporter	Mitochondrial inner membrane; integral to membrane; transport	1.0E-37/ PAAG06563.1	_____		4
	Trehalose-phosphatase	Stress response; Metabolism of energy reserves (e.g. glycogen, trehalose)	1.0E-87/PAAG06703.1	20	_____	
Transcription	ATP-dependent RNA helicase eIF4A (eukaryotic translation initiation factor 4)	ATP-dependent helicase activity, RNA binding, ATP binding, Translation initiation factor activity	1.0E-18/ PAAG00689.1	_____		1
	C2H2 transcription factor – Seb1	Osmotic stress response	1.0E-69/PAAG03287.1	2	_____	
	C6 transcription factor (Ctf1B)	Regulation of transcription; Fungal transcriptional regulatory protein	1.0E-60/PAAG01359.1	_____		15
	Fork head box protein D1	Involvement in early developmental decisions of cell fates during embryogenesis	1.0E-47/PAAG07388.1	1	_____	
	GATA-type NsdD	sexual - Zinc ion binding; Regulation of transcription. Nitrogen regulatory factor	1.0E-52/ PAAG05818.1	22	_____	
	Histone RPD3	deacetylase Transcription control. Modification of acetylation, deacetylation		12		

	RING finger protein	Protein binding, transcription factor activity, nucleous, zinc ion binding, regulation of transcription	1.0E-31/ PADG07987.1	_____	3
	Transcription factor atf1	Regulates transcription in response to stress stimuli. Osmotic stress	1.0E-24/PAAG01945.1	1	_____
	Transcription factor prr1 (HSF)	Regulates transcription in response to stress oxidative and sexual development	0.0/PAAG05064.1	1	_____
	Transcription factor steA	Transcription factor involved in sexual reproduction	0.0/PAAG00406.1	18	_____
	Urg3	DNA replication, transcription, and recombination	0.0/PAAG04190.1	154	_____
	Protein RNP domain	RNA recognition motif. Regulation of alternative splicing	1.0E-28/ PAAG03136.1	2	_____
Signal Transducer	Guanine-nucleotide-binding protein alpha-1 subunit	G-protein coupled receptor protein signaling pathway, signal transducer activity, GTP binding	1.0E-35/ PAAG04436.1	_____	23
	Protein with PYP-like sensor domain (PAS domain)	Detect internal signals cellular and can also sensitivity to environmental factors that cross the cell membrane	1.0E-101/ PAAG06301.1	_____	4
Protein Fate	Arginine N-methyltransferase skb1	Posttranslational modification of amino acids (e.g. hydroxylation, methylation)	1.0E-87/ PAAG02402.1	52	_____
Cellular transport, transport facilities and transport routes	Calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type	Transport facilities	1.0E-46/PAAG00774.1	1	_____
	MFS transporter	Tetracycline transport, integral to membrane, response to antibiotic, tetracycline: hydrogen	1.0E-61/_PAAG06077.1	_____	15

		antiporter activity				
	Pal1 cell morphology protein		ABC transporters; Lipid/fatty acid transport	1.0E-57/PAAG2031.1	1	_____
Cell cycle and DNA processing	Ribonuclease reductase large subunit, C-terminal		DNA synthesis and replication	1.0E-31/PAAG02210.1	1	_____
	SH3 domain-containing protein		Cytokinesis (cell division) /septum formation and hydrolysis	1.0E-78/PAAG02301.1	2	_____
Cell Rescue, Defense and Virulence	HSP70 – like protein		ATP binding; response stress	1.0E-74/ PAAG08003.1	_____	1
Cell growth, cell division and DNA synthesis	Integral membrane Mpv17/PMP22		Environment stress response. May contribute to the unspecific permeability of the organelle membrane (peroxisomes)	1.0E-40/ PAAG02868.1	_____	6
Functional unclassified proteins	GYF domain protein	_____		1.0E-64/PAAG00627.1	5	_____
	Protein 'Pleckstrin (PH) domain	lysine-rich. Homology'		1.0E-50/PAAG03092.1	5	_____
Unclassified protein	Conserved protein	hypothetical		1.0E-135/ PAAG06834.1	25	_____
	Conserved protein	hypothetical		0.0/PAAG07365.1	34	_____
	Conserved protein	hypothetical		1.0E-56/PAAG04733.1	10	_____

Conserved protein	Hypothetical	_____	1.0E-68/PAAG6301.1	3	_____
Conserved protein	hypothetical	_____	1.0E-53/PAAG03580.1	7	_____
Conserved protein	hypothetical	_____	1.0E-101/PAAG05009.1	7	_____
Conserved protein	hypothetical	_____	1.0E-29/PAAG07364.1	2	_____
Conserved protein	hypothetical	_____	1.0E-46/PAAG04732.1	1	_____
Conserved protein	hypothetical	_____	1.0E-33/PAAG03559.1	11	_____
Conserved protein	hypothetical	_____	1.0E-40/PAAG02868.1	11	_____
Conserved protein	hypothetical	_____	1.0E-92/ PAAG_04190.1	_____	1
Conserved protein	hypothetical	_____	0.0/ PAAG06301.1	_____	14
Conserved protein	hypothetical	_____	1.0E-46/ PAAG05850.1	_____	1
Hypothetical protein		_____	1.0E-49/PAAG06820.1	5	_____
Hypothetical protein		_____	1.0E-21/PAAG1170.1	5	_____
Hypothetical protein		_____	1.0E-52/PAAG01169.1	1	_____

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

Table 3: Annotated ESTs up and down-regulated genes of yeast cells during exposure at oenothien B for 180 min versus control yeast cells.

Functional category	Gene product	Function	e-value with genes <i>P. brasiliensis</i> 01/Acession number ^a	Occurrence number up-regulated genes	Occurrence number down-regulated genes
Metabolism	Betaíne aldehyde dehydrogenase	Metabolic process, oxidation reduction, oxidoreductase activity	1.0E-44/ PAAG05392.1	_____	16
	Elongation factor 1-gamma 1 (Glutathione S-transferase)	Translational elongation, eukaryotic translation elongation factor 1 complex GST – Metabolism of vitamins, cofactors and prosthetic groups	1.0E-42/ PAAG03556.1	_____	1
	FAD binding domain-containing protein	Oxidoreductase activity FAD binding	1.0E-3/PAAG05850.1:	_____	5
	Glucose-methanol-choline oxidoreductase, N-terminal	Oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors	1.0E-6/ PAAG_08146.1	3	_____
	Glutamine synthetase	Metabolism of nitrogen by catalyzing the condensation of glutamate and ammonia to form glutamine, precursor of the chitin synthesis	1.0E-9/PAAG_07003.1	3	_____
	Ferric-chelate reductase	Integral to membrane; Oxidation reduction; Electron carrier activity	1.0E-32/ AAG_05370.1	2	_____
Transcription	C6 transcription factor (Ctf1B)	Regulation of transcription; Fungal transcriptional regulatory protein	1.0E-21/ AAG_01359.1	53	_____
	Sexual development transcription factor	Regulation of cellular transcription, DNA-dependent, zinc ion binding, sequence-specific	1.0E-47/ PAAG05818.1	_____	4

	Transcription factor fungi	DNA binding Transcription; DNA binding; Zinc ion binding	1.0-67/ PAAG_02049.1	65	_____
Signal Transduction	Protein with PYP-likesensor domain (PAS domain)	Detect internal signals cellular and can also sensitivity to environmental factors that cross the cell membrane	1.0E-04/PAAG06301.1	_____	44
Biogenesis of Cellular Components	-glucan synthesis-associated protein KRE6	Role in the biosynthesis of -1,6-glucana in the cell wall	1.0E-08/ AAG_00091.1	3	_____
	Arp 2/3 complex subunit Arc16	Regulation of actin filament polymerization; Cytoskeleton	1.0E-24/ AAG_03624.1	12	_____
	Membrane biogenesis protein Yop 1	Eukariotic plasm membrane. Integral to membrane	1.0E-4/PAAG_00481.1	1	_____
Cell growth, cell division and DNA synthesis	Mpv17/PMP22	Integral to membrane	1.0E-56/ PAAG02868.1	_____	15
Protein fate (folding, modification, destination)	Proteasome component PRE6	Proteasomal degradation (ubiquitin/proteasomal pathway); Ubiquitin-dependent protein catabolic process; Proteasome core complex, alpha-subunit complex	0.0/ PAAG_07802.1	6	_____
Protein synthesis	ATP-dependent RNA helicase eIF4A	Nucleic acid binding, ATP-dependent helicase activity	1.0E-85/ PAAG00689.1	_____	9

	CAP 20 – Pathogenesis associated protein	Translation control. Disruption of CAP20 stimulates the growth of yeast cells	1.0E-84/ PAAG06538.1	_____	21
	Ribosomal protein S19/S15	Translation; Structural constituent of ribosome	1.0E-19/ ABG_04880.1	5	_____
Cellular Transporter	MFS transporter	Integral to membrane; Transmembrane transport	1.0E-49/ PAAG01353.1	_____	22
Functional unclassified protein	Uncharacterized protein family UPF0121	Integral to membrane	1.0E-40/ AAG_00184.1	4	_____
Unclassified protein	Conserved hypothetical protein	_____	1.0E-9/PAAG_00520.1	65	_____
	Conserved hypothetical protein	_____	1.0E-0/PAAG_07364.1	2	_____
	Conserved hypothetical protein	_____	1.0E-38/ AAG_07770.1	1	_____
	Conserved hypothetical protein	_____	1.0E-31/ AAG_06925.1	1	_____
	Conserved hypothetical protein	_____	1.0E-52/ PAAG05009.1	_____	3
	Conserved hypothetical protein	_____	1.0E-39/ PAAG05850.1	_____	2
	Hypothetical protein	_____	1.0E-14/ AAG_08066.1	27	_____
	Hypothetical protein	_____	1.0E-17/ AAG_05558.1	1	_____
	Hypothetical protein	_____	1.0E-6/PABG_06807.1	1	_____
	Hypothetical Protein	_____	1.0E-48/ PAAG03580.1	_____	1
	Hypothetical Protein	_____	1.0E-8/PAAG_03099.1	45	_____
	Hypothetical Protein	_____	1.0E-14/ ADG_03257.1	1	_____

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



CAPÍTULO III

Artigo - The malate synthase of *Paracoccidoides brasiliensis* Pb01 is required in the glyoxylate cycle and in the allantoin degradation pathway

The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 is required in the glyoxylate cycle and in the allantoin degradation pathway

PATRÍCIA FERNANDA ZAMBUZZI-CARVALHO*, ALINE HELENA DA SILVA CRUZ*, LUDIER KESSER SANTOS-SILVA*, ALFREDO MIRANDA GOES†, CÉLIA MARIA DE ALMEIDA SOARES* & MARISTELA PEREIRA*

*Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil, and †Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

In the present study, we examined the characteristics of cDNA, the regulation of the gene expression of *Paracoccidioides brasiliensis* MLS (*Pbmls*), and the enzymatic activity of the protein *P. brasiliensis* MLS (*PbMLS*) from the *P. brasiliensis* Pb01 isolate. *Pbmls* cDNA contains 1617 bp, encoding a protein of 539 amino acids with a predicted molecular mass of 60 kDa. The protein presents the MLSs family signature, the catalytic residues essential for enzymatic activity and the peroxisomal/glyoxysomal targeting signal PTS1. The high level of *Pbmls* transcript observed in the presence of two-carbon (2C) sources suggests that in *P. brasiliensis*, the primary regulation of carbon flux into the glyoxylate cycle (GC) was at the level of the *Pbmls* transcript. The gene expression, protein level, and enzymatic activity of *Pbmls* were highly induced by oxalurate in the presence of glucose and by proline in the presence of acetate. In the presence of glucose, the gene expression, protein level, and enzymatic activity of *Pbmls* were mildly stimulated by proline. Our results suggested that *PbMLS* condenses acetyl-CoA from both 2C sources (GC) and nitrogen sources (from proline and purine metabolism) to produce malate. The regulation of *Pbmls* by carbon and nitrogen sources was reinforced by the presence of regulatory motifs CREA and *UIS* found in the promoter region of the gene.

Keywords *Paracoccidioides brasiliensis*, malate synthase, glyoxylate cycle, tricarboxylic acid cycle, carbon and nitrogen sources

Introduction

Microorganisms are able to grow on non-fermentable carbon sources such as acetate, ethanol or fatty acid, since they possess the glyoxylate cycle (GC), an anaplerotic metabolic pathway, which allows the bio genesis

of carbohydrates from two-carbon (2C) units [1]. The GC differs from the tricarboxylic acid cycle (TCA) in that it bypasses the two decarboxylation steps, has two acetyl-CoA entries and generates succinate as the final product. Although both cycles share most enzymes, malate synthase (MLS) and isocitrate lyase (ICL) are specific to the GC [2].

MLS catalyzes the condensation reaction that yields malate from acetyl-CoA and glyoxylate. This reaction is highly specific to those substrates and requires Mg^{2+} as a cofactor [3]. MLS is a key GC enzyme and is also involved in the degradation of purines. It converts the glyoxylate produced from uric acid, allantoin and allantoic acid into malate [4], which

Received 2 June 2006; Received in final revised form 17 October 2006; Accepted 7 November 2006

Correspondence: Maristela Pereira, Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Campus II, Universidade Federal de Goiás, C.P. 131, 74001-970 Goiânia, GO, Brazil. Tel./fax: +55 62 35211110; E-mail: mani@icb.ufg.br

can participate in TCA or dicarboxylic acid cycles (DAC) [5].

In eukaryotic cells, the GC occurs in specialized peroxisomes called glyoxysomes, whereas in prokaryotes it occurs in the cytosolic compartment [6]. In *Saccharomyces cerevisiae*, two isoenzymes encoding to MLS, MLS1 and DAL7, were identified [4]. The subcellular location of MLS, a SKL-terminated protein, was examined in yeast cells grown on different carbon sources. MLS was cytosolic in cells grown on ethanol, whereas it was peroxisomal in cells grown on oleic acid [7].

The GC and the enzymes ICL and MLS were important for the virulence of some pathogens, such as *Mycobacterium tuberculosis* [8], *Candida albicans* [9], *Cryptococcus neoformans* [10] and for that of the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea* [11]. Upon phagocytosis ICL and MLS were induced for the survival of *C. albicans* and *S. cerevisiae* inside the macrophages [9,12].

C. albicans is known to regulate central carbon metabolism in a niche-specific manner during the establishment and progression of disease. During the early stages of a systemic infection, *C. albicans* activates the GC and gluconeogenesis in response to phagocytosis. In the latter stages of an infection, when the fungus is colonizing tissue, glycolytic metabolism predominates. Presumably, this increases the biological fitness of this pathogen within its host [13].

Paracoccidioides brasiliensis is the etiologic agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a chronic and systemic granulomatous disease very common in Latin America [14]. Epidemiological data indicate a broad fungal geographic distribution in Central and South America [15]. Phylogenetic analyses have grouped isolates of *P. brasiliensis* into three groups, with a single exception, the *Pb01* isolate [16]. In isolate *Pb01*, the GC seems to be functional, since ICL and MLS genes were found in transcriptome analyses. The ICL transcript was up-regulated in yeast cells when compared to the mycelial phase [17] and during the infectious process in mice liver [18]. In addition, ICL and MLS were up-regulated during the transition from mycelium to yeast [19,20].

We characterized the MLS cDNA from *P. brasiliensis* (*Pbmls*), *Pb01* isolate, and showed that *PbMLS* and homologues from fungi maintained a high level of conservation. Our results suggest that *PbMLS* was active in the GC when the fungus was grown on 2C sources. In addition, this enzyme seems to be active in the allantoin degradation pathway of the purine metabolism, where the fungus used oxalurate or proline as nitrogen sources.

Materials and methods

Growth conditions of *P. brasiliensis*

P. brasiliensis, isolate *Pb01* (ATCC-MYA-826), was studied in our laboratory [21,22]. It was grown in solid Fava-Netto medium (1.0% 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 and 1.4% w/v agar, pH 7.2) as yeast cells for 7 days at 36°C [23].

For semi-quantitative RT-PCR (sqRT-PCR) experiments, Western blot, and activity assay, yeast cells (1.5 g) were sub-cultured in Mc Veigh & Morton liquid minimal medium (MMcM; 50 ml) [24]. Yeast cells were grown in 2.0% glucose (w/v), 2.2% glycolic acid (w/v), 2.8% potassium acetate (w/v) or 3.0% (v/v) ethanol, for 1 and 3 h, at 36°C and were shaken at 150 rpm to evaluate the *Pbmls* transcript level in different carbon sources. To evaluate *PbMLS* protein level by Western blot and enzymatic activity, cells were cultivated in the above-mentioned same carbon sources for 24 h. In experiments to evaluate the *Pbmls* transcript, protein levels and enzymatic activity of *P. brasiliensis* in the presence of nitrogen sources, yeast cells were grown in MMcM (without amino acids and ammonia) 12 h at 36°C and shaken at 150 rpm. 2.0% (w/v) sodium acetate, pH 6.0 and 0.1% (w/v) proline, or 2.0% (w/v) glucose and 0.1% (w/v) proline or 0.25 mM oxalurate, an allantoin pathway gratuitous inducer, were added. As a control, yeast cells were grown in the presence of 2.0% (w/v) sodium acetate, pH 6.0, or 2.0% (w/v) glucose.

Cloning of the cDNA encoding to *Pbmls*

We had previously obtained a partial cDNA encoding *Pbmls* (Accession Number AAQ75800) of *P. brasiliensis*, *Pb01* isolate. In order to obtain the complete sequence, the anti-sense oligonucleotide (MS2) was drawn based on the C-terminal sequence of the partial cDNA *Pbmls*; a degenerated sense oligonucleotide (MS1) was drawn based on the alignment of encoding MLS cDNA sequences of *Aspergillus nidulans* (GenBank Accession Number XP_664257.1) and *Neurospora crassa* (GenBank Accession Number XP_959453.1). Both oligonucleotides sense MS1 (5'-ATGKCTYMSGTCGASRCYCWKC-3') and anti-sense MS2 (5'-GAGCAAATTTACAGTTTGGCAGCGCTTC-3') were employed in the polymerase chain reaction (PCR).

The PCR reaction was performed with *P. brasiliensis* yeast cDNA library (2 l) [25] as a template, 2.5 mM of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 10 M of each oligonucleotide, PCR buffer containing (KCl 50 mM,

Tris-HCl 10 mM, pH 8.3), 25 mM MgCl₂ and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). PCR conditions were: initial denaturation at 94°C for 3 min followed by 35 thermal cycles at 94°C (1 min), 64°C (2 min), 72°C (1 min) and final extension at 72°C (10 min) (GeneAmp PCR2400, Perkin-Elmer, Stamford, CT). An amplified PCR product of 1617 bp was purified from the gel, subcloned into pGEM-T-Easy vector (Promega, Madison, WI, USA) and sequenced on both strands.

cDNA sequencing and sequence analysis

cDNA sequencing was performed using the double-strand dideoxy-chain termination a MegaBACE 1000 sequencer (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) was used for automated sequence analysis. The analyses of the *Pbmls* cDNA sequence and predicted protein were carried out using the programs available at the ExPASy [26] website. National Center for Biotechnology Information (NCBI) servers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) [27] were used for Blast database searches. Multiple sequence alignments were performed using CLUSTAL X [28].

DNA extraction of *P. brasiliensis* and Southern blot analysis

P. brasiliensis Pb01 yeast cells were harvested, washed and frozen in liquid nitrogen. Grinding with a mortar and pestle broke the cells, and the cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method as described by Del-Sal *et al.* (1989) [29] was used to prepare genomic DNA. The cell powder was suspended in extraction buffer [(2% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP), 1.4 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.02 M ethylenediaminetetracetic acid (EDTA), 2% (w/v) CTAB]. The mixture was incubated at 65°C for 1 h, extracted with 50% chloroform/50% isoamyl alcohol and precipitated with 100% ethanol. After treatment with RNase I, the DNA was precipitated with ethanol, centrifuged, resuspended in sterile water and stocked at -20°C.

The total DNA (20 µg) was digested with the restriction enzymes *Xho*I, *Dra*I, *Eco*RV, and *Hind*III. Standard conditions for electrophoresis were used [30]. The blot was probed to full-length cDNA *Pbmls*, labeled using the Gene Images Random Prime labeling module (GE Healthcare) and washed under high-stringency conditions [60°C, 1.0×SSC (0.15 M NaCl, 0.015 M trisodium citrate), 0.1% (w/v) SDS and 0.5×SSC, 0.1% (w/v) SDS] according to the manufacturer's instructions. Hybridization was detected with the Gene Image CDP-Star detection module (GE Healthcare).

RNA isolation

Total RNA from *P. brasiliensis* Pb01 yeast cells was obtained using the Trizol reagent following the supplier's instructions (Invitrogen Life Technologies). To remove genomic DNA contamination, the RNA samples were treated with RNase-free DNase-I (Promega) at room temperature for 15 min following standard procedures.

cDNA synthesis and sqRT-PCR

The first-strand cDNA was synthesized from the total RNA (1 µg) using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies) and 2.5 µM antisense synthetic oligonucleotide dT15, with a final reaction volume of 20 µl. Reactions were incubated at 42°C for 90 min, followed by the addition of 80 µl TE buffer (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) and incubation for 7 min at 72°C to inactivate the reverse transcriptase. In the control reactions, 2.5 µM of anti-sense synthetic oligonucleotide 28S-A was used, constructed on the basis of the 28S ribosomal gene sequence (nucleotide 225 to 243) of *P. brasiliensis* (*Pb*28S) (GenBank Accession Number AY445662).

To synthesize double-strand DNA, the PCR reactions were carried out with the RT reactions (3 µl) as template, 2.5 M of the oligonucleotides MS3 (5'-CGCAATGGGTGGCAT GGC-3') and MS2, 25 mM MgCl₂, 2.5 mM of each dNTP, 2.5 U *Taq* DNA polymerase. In the control reactions, 2.5 M of the oligonucleotides 28S-A (5'-CGGATCAGGTAGGGATACC-3') and 28S-S (5'-CGAAGACGGGATTCTCACC-3') were used. The oligonucleotide 28S-S was also constructed, based on the *Pb*28S gene (nucleotide 21 to 39). PCR conditions were: initial denaturation at 94°C for 3 min followed by 30 thermal cycles at 94°C (1 min), 60°C (2 min), 72°C (1 min) and final extension at 72°C (10 min) (GeneAmp PCR2400). The number of amplification cycles was standardized before the reactions reached a plateau. Amplifications were analyzed in electrophoresis in agarose gel (1%). Scion Image Beta 4.03 was used to capture and quantify the images [31].

Antibody production

The cDNA encoding the *Pb*MLS was subcloned into the expression vector pGEX-4T-3 to obtain the recombinant protein overexpressed in *Escherichia coli* BL21 C43 (DE3). The recombinant protein was used to produce anti-*Pb*MLS polyclonal antibody in New Zealand rabbits. The immunization protocol consisted of an initial injection of recombinant protein (200 µg) in complete Freund's adjuvant and two subsequent injections of the same

amount of the antigen in incomplete Freund's adjuvant. Each immunization was followed by an interval of 14 days. Fifteen days after the third immunization, the serum containing anti-*PbMLS* polyclonal antibody was collected and stored at -20°C . Western blot was used to test the serum's reactivity to the *PbMLS* recombinant protein.

Protein extraction of *P. brasiliensis* yeast cells

P. brasiliensis *Pb01* yeast cells grown for 24 h in liquid minimal medium MMcM with different carbon sources and for 12 h with different nitrogen sources (see growth conditions) were centrifuged for 5 min at 2500 g. Proteins were extracted according to Ebel *et al.* (2006) [32] with modifications. The cells were washed with sterilized water and frozen in liquid nitrogen. The material was ground to a fine powder that was harvested and agitated for 20 min at 4°C with glass beads and 500 μl of 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0 supplemented with 1 mM dithiothreitol (DTT). After this, the material was centrifuged once at 5,000 g for 15 min at 4°C , and the supernatant was harvested and centrifuged twice at 12,000 g for 15 min at 4°C . The resulting extract was stocked at -20°C for further analyses. The protein extract was quantified according to Bradford (1976) [33].

Western blot analysis

The proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to a nylon membrane and checked for equal loading by Ponceau S. The membrane was washed with water and incubated in a buffer containing PBS (50 mM) and 0.1% (v/v) Tween-20, 5% (w/v) skimmed milk powder for 18 h at 4°C . After three 10-minute treatments in washing buffer (50 mM PBS, 0.1% (v/v) Tween-20), the membrane was incubated for 2 h at 37°C with rabbit polyclonal antibody (diluted 1:4000 in PBS) to detect *PbMLS*. Then, the membrane was washed three times with washing buffer and incubated for 1 h at 37°C with the secondary antibody alkaline phosphatase coupled with anti-rabbit IgG (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO). At this point, the membrane was washed for 10 min in washing buffer, 10 min in PBS and 10 min in alkaline phosphatase buffer (100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 100 mM Tris-HCl, pH 9.5). The blots were developed with 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitro-bluetetrazolium (BCIP/NBT). Negative controls were obtained using rabbit preimmune serum. The images were acquired by scanning and the bands were quantified with Scion Image Beta 4.03.

Enzymatic activity

MLS activity was determined as described by Dixon and Kornberg (1959) [34] and modified by Polakis and Bartley (1965) [35]. The enzymatic assay was carried out at room temperature. The assay buffer (0.1M K_2HPO_4 , pH 6.5; 10mM MgCl_2) was freshly prepared from its components. 25 μg samples were added to 500 μl assay buffer containing 5mM acetyl-CoA (20 μl) and water to a volume of 980 μl . The reaction had the optical densities read at 232 nm until stabilization. The enzymatic reaction was started by the addition of 100 mM glyoxylate (20 μl). The method is based on the consumption of acetyl-CoA at 232 nm. The activity was calculated considering that one unit at 232 nm is defined as 222 nmols/mg of acetyl-CoA. The specific activities were given in U/mg protein, with U being equal at nmol/min.

Results and Discussion

Nucleotide, predicted amino acid sequence and sequence similarity of *Pbmls*

The *Pbmls* cDNA sequence was composed of 1882 bp, comprising an ORF of 1617 bp and a 3' untranslated region of 265 bp. A polyadenylation signal, ATAA, was identified 118 nucleotides downstream of the TAA termination codon (data not shown). Howard *et al.* (2000) [36] suggested three different families or types of MLSs based on size of the amino acid sequences: long, intermediate and short. Most MLSs, including those from higher plants, as well as bacterial and fungal enzymes, are from the intermediate family. Some microorganisms, such as *E. coli* [37], *Deinococcus radiodurans* [38] and *S. cerevisiae* [4,7], possess two classes of MLSs, encoded by different genes. In this study, it was observed that *PbMLS* encodes a predicted protein of 539 amino acid residues (Supplementary Fig. 1 – online version only), with a molecular mass of 60 kDa and calculated *pI* of 8.45. This suggests that *PbMLS* belongs to the intermediate MLSs family.

A public database search revealed that *PbMLS* presents characteristic motifs (Supplementary Fig. 1). The signature sequence described for MLSs ([K/R]-[D/E/N/Q]-H-X (2)-G-L-N-C-G-R-W-D-Y-[L/I/V/M]-F) was found in *PbMLS* (268-283) as RDHSSGLNCGRWYIF [39,40]. *PbMLS* has the AKL tripeptide that is a peroxisomal/glyoxysomal targeting signal PTS1 [41], suggesting that *PbMLS* could be directed to the peroxisomes of *P. brasiliensis*. The PTS1, defined by the consensus (A/C/S)-(K/R/H)-(L/M) [42], was also found in other MLS sequences [43].

A BLAST search in the GenBank database showed that the deduced amino acid sequence of *PbMLS* was

not identical to that of fungus MLSs. Clustal X was used to align predicted *PbMLS* with reported sequences. High levels of identity were observed with MLSs from *Coccidioides immitis* (89%), *Aspergillus fumigatus* (87%), *Aspergillus oryzae* (86%), and *A. nidulans* (84%). Also, high levels of identity of amino acid residues were identified at the catalytic site (Supplementary Fig. 1).

Amino acids involved in the catalytic site were identified in the MLS of the *E. coli* MSG. The Arg 338 amino acids form a hydrogen bond with the aldehyde oxygen of glyoxylate, Glu427 and Asp455 and bind the magnesium ion; Asp 631 is the proposed catalytic base [36]. These amino acids were also present in the MLS of *M. tuberculosis* (GlcB) [44]. In *PbMLS*, they were identified in the Arg168, Glu252, Asp280 and Asp 449 positions, respectively (Supplementary Fig. 1), suggesting that they may be involved in the formation of the active site of the protein.

Southern blot analysis

The genomic organization of the MLS in *P. brasiliensis* was analyzed by Southern blot. Total DNA was digested with the

restriction endonucleases *XhoI*, *DraI*, *EcoRV* and *HindIII*. The DNA was fractionated on agarose gel (1%) and hybridized with the complete cDNA *Pbmls* as a probe, as shown in Fig. 1. Southern blot analysis was able to detect a single DNA fragment in the *P. brasiliensis* DNA digested with the restriction enzymes *XhoI* and *DraI* (Fig. 1, lanes 1 and 2). *EcoRV* and *HindIII* digestion produced fragments consistent, in number and size, with the single restriction site presumed to occur in *Pbmls* (Fig. 1, lanes 3 and 4). The restriction profiles indicated that the *P. brasiliensis* genome contained a single copy of gene encoding MLS. The presence of only one *mls* gene in *P. brasiliensis*, isolate *Pb01*, was confirmed by analyses in the *Pb01* structural genome from the Broad Institute [40].

Pbmls transcript, protein levels and activity are regulated by carbon sources

Since MLS enzyme acts on the GC, 2C sources were used in the experiments. Yeast cells were grown in the presence of glucose, glycolic acid, potassium acetate and ethanol

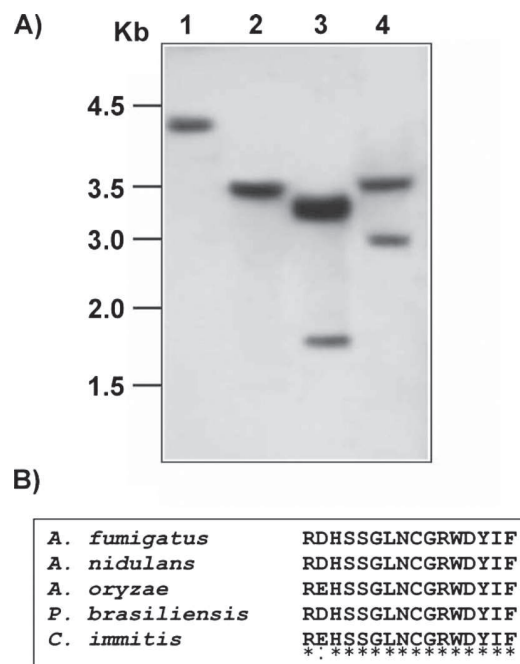


Fig. 1 (A) Southern blot analysis. Twenty micrograms of total DNA was digested with the following restriction enzymes: *XhoI* (lane1), *DraI* (lane2), *EcoRV* (lane3), and *HindIII* (lane4). The blot was hybridized to the *Pbmls* cDNA probe. The positions of the size markers are indicated. (B) Alignment of the deduced amino acid sequence of the characteristic signature present on protein belonging to the MLSs class of *PbMLS* with MLSs from fungi. Asterisks indicate conserved amino acid residues. The symbol (:) denote similarity between each corresponding amino acid pair. The accession numbers are the following: *Paracoccidioides brasiliensis* – AAQ75800, *Coccidioides immitis* – EAS27501, *Aspergillus fumigatus* – XP747723, *Aspergillus oryzae* – BAE54993 and *Aspergillus nidulans* – XP664257.

and used as carbon sources for a period of 1 and 3 h for RNA extraction and 24 h for protein extraction. To evaluate *Pbmls* transcript, protein, and enzymatic activity levels in different carbon sources and to analyze the putative role of the enzyme in metabolic routes, sqRT-PCR was performed using total RNA and Western blot and an activity assay was done using the total protein extract of *P. brasiliensis*.

After 1 h of incubation, the *Pbmls* transcript level was similar in all carbon sources. The transcript level in the presence of glucose decreased after 3 h of treatment and was lower than that of other carbon sources. After 3 h, the transcript level had increased in the presence of glycolic acid, potassium acetate and ethanol when compared to the level after 1 h. The data are displayed in the Fig. 2A. Fig. 2B shows the transcript level after 1 h and 3 h of treatment. These results suggest that in *P. brasiliensis*, the primary regulation of carbon flux into the glyoxylate pathway was at the *Pbmls* transcript level.

To facilitate data visualization, Scion Image Beta 4.03 was used for a densitometric analysis. Relative expression values were calculated using the ratios of *Pbmls* and *Pb28S* to transcripts and of formamidase to protein. The ratio values obtained relative to different treatments were compared to glucose.

The protein extracts were subjected to gel electrophoresis analysis and stained with Coomassie blue (Fig. 2C). The samples were blotted to nylon membranes and immunoblotted using anti-*PbMLS* polyclonal antibody obtained against recombinant protein (data not shown). A positive reaction corresponding to *PbMLS* (60 kDa) was obtained in all conditions and significant expression level differences can be observed (Fig. 2D). The highest expression level was found for cells growing in the presence of potassium acetate, followed by glycolic acid, ethanol and glucose. A similar pattern was observed in the *MLSs* of *Streptomyces griseus* and *Streptomyces clavuligerus*, where genes were induced in cells growing in acetate as a carbon source [46]. No cross-reactivity to the rabbit preimmune serum was evident from the samples (Fig. 2E). Formamidase (45 kDa) was used as an internal control for equal protein quantity in the different samples (Fig. 2F).

Pbmls activity was evaluated after yeast cells had grown in the presence of glucose, glycolic acid, potassium acetate and ethanol for 24 h. The highest specific activity level was found for cells growing in the presence of potassium acetate (3729.6 U/mg), followed by glycolic acid (3128.0 U/mg), ethanol (1953.6 U/mg) and glucose (834.7 U/mg). In Fig. 2G the transcript and protein levels and specific activity were compared to those of glucose.

The presence of *Pbmls* transcripts, protein, and enzyme activity in all carbon sources evaluated demonstrated that

the yeast phase of *P. brasiliensis* induces the GC regardless of the carbon source. Several pathways that provide substrates for GC were up-regulated in the yeast cells grown on rich medium [17]. Here the overexpression and regulation of *Pbmls* by carbon sources could indicate that it is a key enzyme for the GC, and could act together with ICL to regulate carbon influx through the GC. The induction of the GC in *P. brasiliensis* yeast cells grown on rich and carbon-controlled media indicate complex metabolic regulation.

Pbmls transcript, protein levels and activity are regulated by nitrogen sources

Analysis of *P. brasiliensis* transcriptome permitted the identification of all genes involved on the allantoin degradation pathway, which is induced by nitrogen sources, producing glyoxylate by the reversible ureidoglycollate hydrolase catalyzed reaction [47,48]. The function of the *MLS* enzyme is to remove toxic glyoxylate from the cell [47,49]. In this way, proline and oxalurate, an allantoin pathway gratuitous inducer, were used here to verify the participation of *Pbmls* in the allantoin degradation pathway. The combination of 2C, 6C (six-carbon) and nitrogen sources was used to evaluate the activity of *PbMLS* on glyoxylate from the GC or the allantoin degradation pathway and to keep the fungus growing.

P. brasiliensis *Pb01* yeast cells were incubated in the presence of proline, as a nitrogen source or oxalurate, an allantoin pathway gratuitous inducer, for sqRT-PCR, Western blot, and enzymatic activity analysis. The treatments were combined with carbon sources (glucose or sodium acetate) or in the presence of a single carbon source, as a control, for 12 h.

After 12 h of incubation a high induction of *Pbmls* transcript on acetate/proline medium was observed when compared to acetate without proline. The *Pbmls* transcript level in glucose/oxalurate medium was higher than in glucose/proline medium or in the treatment with glucose without oxalurate or proline (Fig. 3A).

The protein extracts were subjected to gel electrophoresis analysis and stained with Coomassie blue (Fig. 3B). The samples were blotted to nylon membranes and immunoblotted. A positive reaction corresponding to *PbMLS* (60 kDa) was obtained in all conditions. Significant differences in expression level were observed (Fig. 3C). When the cells were grown in the presence of oxalurate as the nitrogen source, the *PbMLS* expression level was higher than with sodium acetate/proline, sodium acetate, glucose/proline and glucose only. No cross-reactivity to the rabbit preimmune serum was evidenced with the samples (Fig. 3D). Formamidase (45 kDa) was used as an internal control to ensure equal protein quantity in the different samples (Fig. 3E).

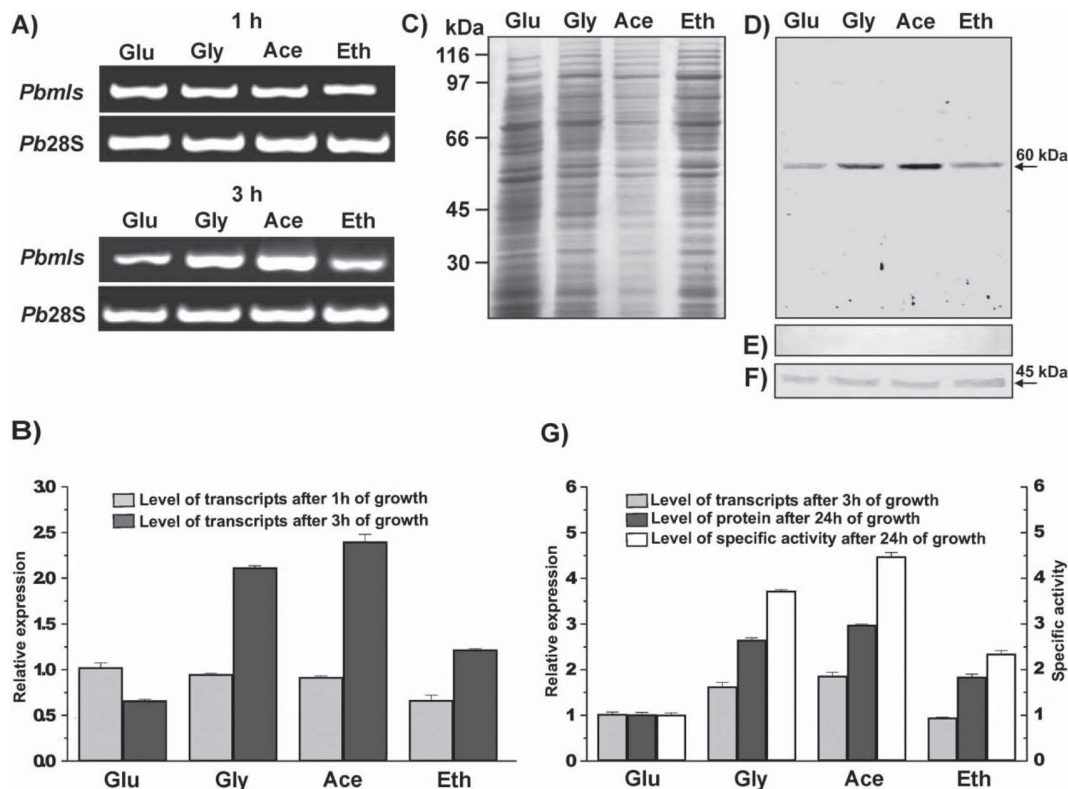


Fig. 2 Evaluation of the *PbmIs* transcripts and protein levels and enzymatic activity in yeast cells in different carbon sources. (A) Comparative analyses of *PbmIs* gene expression from *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells were performed by sqRT-PCR analysis with oligonucleotides MS2 and MS3. The control reaction was performed using oligonucleotides (28S-S and 28S-A) constructed on the basis of the *Pb28S* gene. The expression values were calculated using the ratio between *PbmIs* and *Pb28S*. Using varied cycle numbers the exponential amplification phase was determined and used to allow semi-quantitative analysis of the reactions. The same amounts of cDNAs were used for all PCRs. The RNAs used for sqRT-PCR were obtained from samples of *P. brasiliensis* yeast cells grown for 1 h and 3 h on the following carbon sources: Glucose 2.0% (Glu), Glycolic acid 2.2% (Gly), Potassium acetate 2.8% (Ace) and Ethanol 3.0% (Eth). Gene names are written on the left side of each figure. The sizes of the amplified cDNA fragments are 637 bp to *PbmIs* and 223 bp to *Pb28S*. (B) Densitometric analysis of the level expression transcripts after 1 h and 3 h of treatment. Ratios referring to different treatments were compared to glucose to produce the graph. (C) SDS-PAGE analysis of proteins (20 µg) after 24 h in the same treatment as in A. The values of protein levels were calculated from the ratio of *PbmIs* to formamidase. Numbers to the left refer to the marker molecular mass. (D) Reactivity of the *P. brasiliensis* MLS analyzed by Western blotting with the polyclonal antibody produced by rabbit recombinant protein. (E) Reactivity analyzed by Western blotting with the rabbit preimmune serum. (F) Reactivity of the *P. brasiliensis* formamidase analyzed by Western blotting with the polyclonal antibody produced by the recombinant protein. (G) Comparison between *P. brasiliensis* MLS transcripts and protein levels obtained from sqRT-PCR, Western blot and *PbMLS* specific activity. The values were calculated in relation to glucose. The Y axis shows relative expression to the left (gene/28S or gene/formamidase), and specific activity to the right.

PbmIs activity was evaluated after yeast cells were grown under the above conditions. The highest level of activity was found in cells grown in the presence of oxalurate/glucose (2699.52 U/mg), followed by that of cells grown in the presence of sodium acetate/proline (2486.4 U/mg), sodium acetate (1634.0 U/mg), glucose/proline (710.4 U/mg), and glucose only (532.8 U/mg). Densitometric analyses were carried out as shown in Fig. 2. In Fig. 3F, the transcript and protein levels and specific activity were compared in relation to glucose.

In *S. cerevisiae*, the *DAL7* gene, which codes a MLS, is required for allantoin degradation, and its expression exhibits

all the regulatory characteristics of the other allantoin pathway genes; it is induced by oxalurate, an allantoin pathway inducer [50]. The high induction of *PbmIs* in the presence of acetate/proline and glucose/oxalurate indicates that the fungus can use allantoin as a nitrogen source, since proline is degraded to allantoin, producing glyoxylate during the purine metabolism, and oxalurate is an inducer of the genes of the allantoin degradation pathway [51]. In the presence of glucose/proline, the *PbmIs* expression was mildly stimulated indicating that the metabolism of the proline, which is not an obligated activator of the allantoin degradation pathway, is following preferentially through its classical pathway to

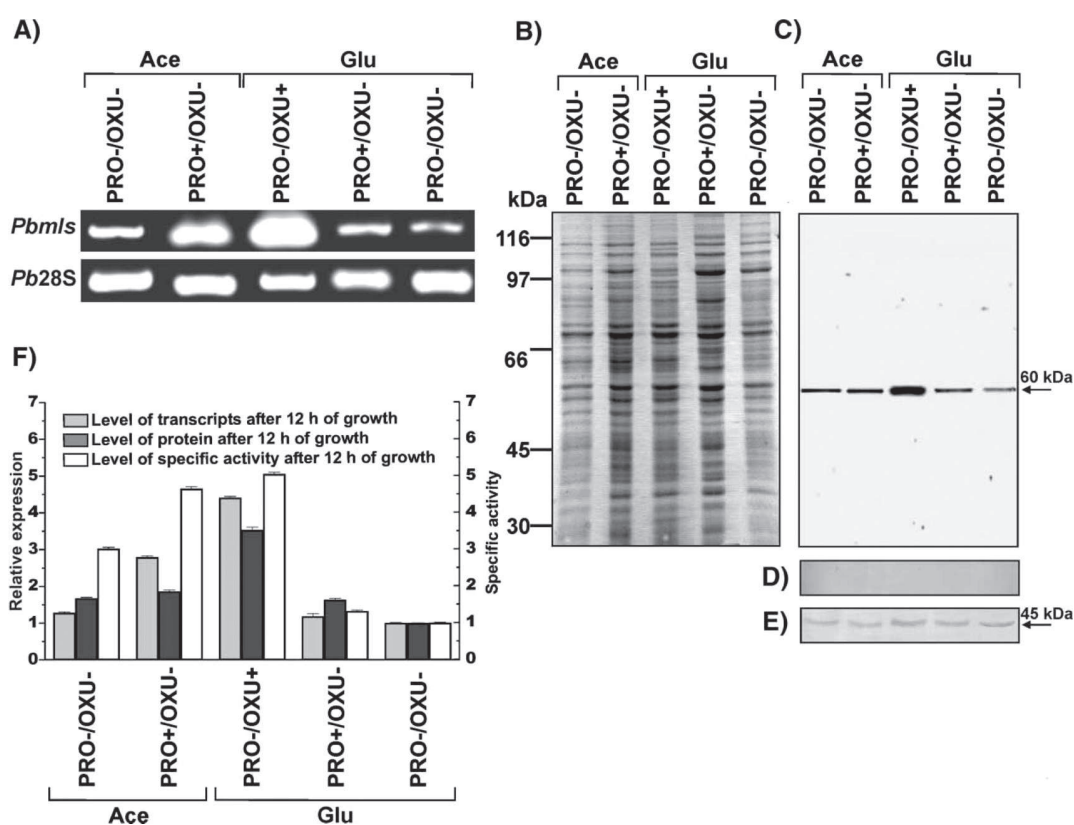


Fig. 3 Evaluation of *Pbmls* transcripts protein levels and enzymatic activity after growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells in nitrogen sources. (A) sqRT-PCR analysis was carried out with oligonucleotides MS2 and MS3. The reaction control was performed using oligonucleotides (28S-S and 28S-A). The expression values were calculated from the ratio of *Pbmls* to *Pb28S*. Using varied cycle numbers the exponential amplification phase was determined and used to allow semi-quantitative analysis of the reactions. The same amounts of cDNAs were used for all PCRs. The RNAs used for sqRT-PCR were obtained from samples of *P. brasiliensis* yeast cells grown for 12 h on nitrogen sources L-Proline 0.1% (PRO) or oxalurate 0.25 mM (OXU) associated with the following carbon sources: Glucose (Glu) 2.0% or Sodium Acetate (Ace) 2.0%, pH 6.0. A positive signal (+) indicates presence and a negative signal (-) indicates absence of the compound. Gene names are written on the left side of each figure. The sizes of the amplified cDNA fragments are 637 bp to *Pbmls* and 223 bp to *Pb28S*. (B) SDS-PAGE analysis of proteins (20 µg) after 12 h in the same treatment as in A. The protein levels were calculated from the ratio of *Pbmls* to formamidase. Numbers to the left refer to the marker molecular mass. (C) Reactivity of the *P. brasiliensis* MLS analyzed by Western blotting with the polyclonal antibody produced by the recombinant protein. The protein levels were calculated from the ratio of *Pbmls* to formamidase. (D) Reactivity analyzed by Western blotting with the rabbit preimmune serum. (E) Reactivity of the *P. brasiliensis* MLS transcripts analyzed by Western blotting with the polyclonal antibody produced by recombinant protein. (F) Comparison between *P. brasiliensis* MLS transcripts and protein levels obtained from sqRT-PCR, Western blot and specific activity of *PbMLS* enzyme. The values were calculated in relation to glucose. The Y axis shows relative expression to the left (gene/28S or gene/formamidase), and specific activity to the right.

glutamate and then to alpha-ketoglutarate to feed TCA cycle. The experiments with oxalurate were not performed with acetate as the carbon source since acetate medium possesses a pH of 6.0, which does not permit transport of oxalurate into the cell [52].

A model for utilization of 2C and nitrogen sources in *P. brasiliensis*

On the basis of our results, a model for utilization of 2C and nitrogen sources in *P. brasiliensis* Pb01 was proposed

(Fig. 4A). The analysis of transcript, protein levels, and enzymatic activity in the presence of different carbon sources suggests that *PbMLS* condenses acetyl-CoA from 2C sources with glyoxylate yielding malate in the GC. In the presence of a nitrogen source, the glyoxylate produced from proline and purine metabolism was condensed with acetyl-CoA producing malate by *PbMLS* action. Proline can also follow through its classical pathway to glutamate and then to alpha-ketoglutarate to feed TCA cycle. To our knowledge, *PbMLS* is the first enzyme to be described as acting in both routes: in the GC, when 2C

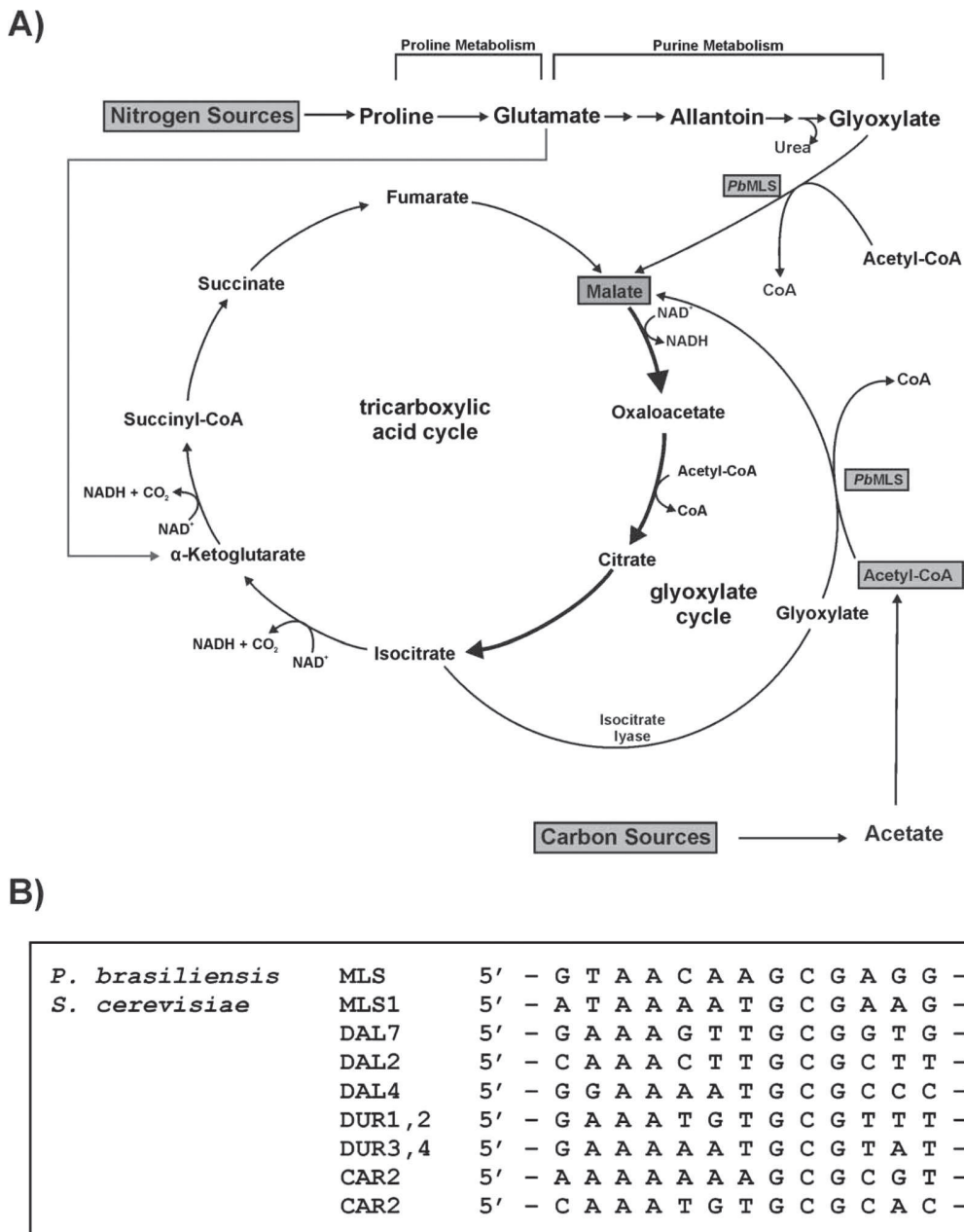


Fig. 4 (A) Model for utilization of 2C and nitrogen sources in *Paracoccidioides brasiliensis*. Thick lines represent steps in common of the cycles. (B) Comparison of sequences situated 5' from the *Pbmls* gene with upstream induction sequences (*UIS*) contained in the upstream regions of *S. cerevisiae* genes that respond to the allantoin pathway inducer, allophanate (Hartig et al., 1992 [4]).

sources are used, and in the allantoin degradation pathway from purine metabolism, when used oxalurate or proline is used as a nitrogen sources. In both routes, *PbMLS* condenses glyoxylate and acetyl-CoA to yield malate, which is a central molecule of the TCA or GC.

Analysis of the *Pbmls* promoter region identified the presence of CREA (5'-SYGGRG-3') (data not shown)

and upstream induction sequence (*UIS*) [50] regulatory motifs (Fig. 4B), indicating that *Pbmls* could be regulated by carbon and nitrogen, respectively. In addition, all enzymes involved in the proline and purine metabolism to form glyoxylate were found in transcriptomes of *P. brasiliensis* [17,18]. Taken together, these data reinforce the model proposed above.

Acknowledgements

This study, carried out at Universidade Federal de Goiás, was supported by Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and by International Foundation for Science (IFS), Stockholm, Sweden, through a grant to Maristela Pereira. P.F.Z.C., A.H.S.C. and L.K.S.S. were supported by a fellowship from CAPES.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Kornberg HL. The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *J Biochem* 1966; **99**: 1–11.
- Kornberg HL, Krebs HA. Synthesis of cell constituents from C₂-units by a modified tricarboxylic acid cycle. *Nature* 1957; **179**: 988–991.
- Dixon GH, Kornberg HL, Lund P. *Biochim Biophys Acta* 1960; **41**: 217–233.
- Hartig A, Simon MM, Schuster T, et al. Differentially regulated malate synthase genes participate in carbon and nitrogen metabolism of *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 1992; **20**: 5677–5686.
- Ornston LN, Ornston MK. Regulation of glyoxylate metabolism in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1969; **98**: 1098–1108.
- Trelease RN, Becker WM, Burker JJ. Cytochemical localization of malate synthase in glyoxysomes. *J Cell Biol* 1974; **60**: 483–495.
- Kunze M, Kragler F, Binder M, Hartig A, Gurvitz A. Targeting of malate synthase 1 to the peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae* cells depends on growth on oleic acid medium. *Eur J Biochem* 2002; **269**: 915–922.
- Mckinney JD, Höner zu Bentrup K, Muñoz-Elias EJ, et al. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 2000; **17**: 735–738.
- Lorenz MC, Fink GR. Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukary Cell* 2002; **1**: 657–662.
- Rude TH, Toffaletti DL, Cox GM, Perfect JR. Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2002; **70**: 5684–5694.
- Thines ER, Webber RW, Talbot NJ. MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporth grisea*. *Plant Cell* 2000; **12**: 1703–1708.
- Lorenz MC, Bender JA, Fink GR. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryotic Cell* 2004; **3**: 1076–1087.
- Barelle CJ, Priest CL, Maccallum DM, et al. Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. *Cellular Microbiol* 2006; **8**: 961–971.
- Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 1993; **6**: 89–117.
- San-Blas G, Niño-Veja G. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In: Cihlar RL, Calderone RA (eds). *Fungal Pathogenesis: Principles and Clinical Applications*. New York: Marcel Dekker, 2001; 205–226.
- Carrero LL, Niño-Vega G, Teixeira MM, et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol* 2008; **45**: 605–612.
- Felipe MS, Andrade RV, Arraes FB, et al. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem* 2005; **280**: 24706–24714.
- Costa M, Borges CL, Bailão AM, et al. Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. *Microbiology* 2007; **153**: 4194–4207.
- Bastos KP, Bailão AM, Borges CL, et al. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol* 2007; **10**: 7–29.
- Nunes LR, Oliveira RC, Leite DB, et al. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryotic Cell* 2005; **4**: 2115–2128.
- Bonfim SMRC, Cruz AHS, Jesuino RSA, et al. Chitinase from *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular cloning, structural, phylogenetic, expression and activity analysis. *FEMS Immunol Med Mic* 2006; **46**: 269–283.
- Bailão AM, Schrank A, Borges CL, et al. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microbes Infect* 2006; **12-13**: 2686–2697.
- Fava-Netto C. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na Blastomicose Sul-Americana com antígenos polissacarídicos. *Arq Cirurg Clin Exp* 1995; **18**: 197–254.
- Restrepo A, Jiménez B. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *J Clin Microbiol* 1980; **12**: 279–281.
- Felipe MS, Andrade RV, Petrofeza SS, et al. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast* 2003; **20**: 263–271.
- ExpASY.org [homepage on the internet]. Expert Protein Analysis System. Available from: <http://www.expasy.org>
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DA. Basic local alignment search tools. *J Mol Biol* 1990; **215**: 403–410.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl Acids Res* 1997; **24**: 4876–4882.
- Del-Sal G, Manfioletti G, Schneider C. The CTAB – DNA precipitation method: a common miniscale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Bio Techniques* 1989; **7**: 514–519.
- Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2th edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Scioncorp.com [homepage on the internet]. Maryland: Scion Corporation Available from: http://www.scioncorp.com/pages/scion_image_windows.htm
- Ebel F, Schwienbacher M, Beyer J, et al. Analysis of the regulation, expression, and localization of the isocitrate lyase from *Aspergillus fumigatus*, a potential target for antifungal drug development. *Fungal Genet Biol* 2006; **43**: 476–489.
- Bradford MM. A dye binding assay for protein. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248–254.
- Dixon GH, Kornberg HL. Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. *J Biochem* 1959; **72**: 3P.
- Polakis ES, Bartley W. Changes in the enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae* during aerobic growth on different carbon sources. *J Biochem* 1965; **97**: 284–297.
- Howard BR, Endrizzi JA, Remington SJ. Crystal structure of *Escherichia coli* malate synthase G complexed with magnesium and

- glyoxylate at 2.0 Å resolution: Mechanistic implications. *Biochemistry* 2000; **39**: 3156–3168.
- 37 Molina I, Pellicer MT, Badia J, Aguilar J, Baldoma L. Molecular characterization of *Escherichia coli* malate synthase G. Differentiation with the malate synthase A isoenzyme. *Eur J Biochem* 1994; **224**: 541–548.
- 38 White O, Eisen JA, Heidelberg JF, et al. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* 1999; **286**: 1571–1577.
- 39 Wang ZX, Brämer CO, Steinbüchel A. The glyoxylate cycle bypass of *Ralstonia eutropha*. *FEMS Microbiol Lett* 2003; **228**: 63–71.
- 40 Nogales J, Guijo MI, Quesada A, Merchán F. Functional analysis of the malate synthase from *Clamydomonas reinhardtii*. *Planta* 2004; **219**: 325–331.
- 41 Gould SJ, Keller GA, Subramani S. Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. *J Cell Biol* 1987; **105**: 2923–2931.
- 42 Gould SK, Keller GA, Subramani S. Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins. *J Cell Biol* 1988; **107**: 897–905.
- 43 Valenciano S, DE Lucas JR, Klei IV, Veenhuis M, Laborda F. Characterization of *Aspergillus nidulans* peroxisomes by immunoelectron microscopy. *Arch Microbiol* 1998; **170**: 370–376.
- 44 Smith CV, Huang CC, Miczak A, et al. Biochemical and structure of malate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 2002; **278**: 1735–1743.
- 45 Broad Institute.com [homepage on the internet]. Harvard: Broad Institute Community. Available from: http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis.1/MultiHome.html
- 46 Chan M, Sim TS. Malate synthase from *Streptomyces clavuligenes* NRRL 3585: cloning, molecular characterization and its control by acetate. *Microbiology* 1998; **144**: 3229–3237.
- 47 Gaudy ET, Bojanowski R, Valentine RC, Wolfe RS. Ureidoglycolate synthetase of *Streptococcus allantoicus*. I. Measurement of glyoxylate and enzyme purification. *J Bacteriol* 1965; **90**: 1525–1530.
- 48 Cooper TG. Metabolism abs Gene Expression. In: Strathern JN, Jones EW, Broach J (eds). *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982; 39–99.
- 49 Rodriguez D, Ginger RS, Baker A, Northcote DH. Nucleotide sequence analysis of a cDNA clone encoding malate synthase of castor bean (*Ricinus communis*) reveals homology to DAL7, a gene involved in allantoin degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol Biol* 1990; **15**: 501–504.
- 50 Yoo HS, Cooper TG. The DAL7 promoter consists of multiple elements that cooperatively mediate regulation of the gene's expression. *Mol Cell Biol* 1989; **9**: 3231–3243.
- 51 Sumrada R, Cooper TG. Oxaluric acid: a non-metabolized inducer of the allantoin degradative enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 1974; **117**: 1240–1247.
- 52 Cooper TG, Mckelvey J, Sumrada RA. Oxalurate transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 1979; **139**: 917–923.

This paper was first published online on iFirst on 4 February 2009.



CONCLUSÃO

CONCLUSÕES

- i. Os processos influenciados por oenoteína B e os compostos utilizados atualmente no tratamento da PCM (anfotericina B, itraconazol, sulfametoxazol e bactrim[®]) foram identificados e indicam que oenoteína B poderia ser utilizada juntamente com os antifúngicos;
- ii. Os estudos realizados através da análise de ESTs induzidas e reprimidas do fungo *P. brasiliensis* na presença do composto bioativo oenoteína B, da planta *E. uniflora*, puderam identificar a presença de transcritos envolvidos no remodelamento da parede celular do fungo, bem como genes envolvidos com estresse osmótico, possibilitando a elaboração de um provável modelo de resposta do fungo ao composto;
- iii. A resposta de oenoteína B com foco em apenas dois únicos e importantes processos celulares (remodelamento da parede celular e estresse osmótico) sugere que oenoteína B atue em *P. brasiliensis*;
- iv. *Pbmls* se apresentou com uma ORF de 1617 pares de base que codifica uma proteína de 539 resíduos de aminoácidos, com uma massa molecular predita de 60 kDa;
- v. Análises de *Southern blot* detectaram uma única cópia do gene codificante para MLS, no genoma de *P. brasiliensis*;
- vi. Os níveis de transcritos, proteínas e atividade específica de *Pbmls*, na presença de fontes de 2C, mostraram-se aumentados em acetato de potássio, ácido glicólico e etanol, respectivamente, em relação à glicose, indicando que *PbMLS* seria uma enzima específica para o ciclo do glioxalato, e poderia atuar, juntamente com *PbICL*, a regular o fluxo de carbono;
- vii. Os níveis de transcritos, proteínas e atividade específica de *Pbmls*, na presença de fontes de nitrogênio, mostraram-se aumentados em glicose/oxalurato, acetato

de sódio/prolina, acetato de sódio, glicose/prolina e glicose somente, indicando que o fungo pode utilizar alantoína como fonte de nitrogênio;

- viii. As análises de transcritos, níveis de proteínas e atividades enzimáticas na presença de diferentes fontes de carbono e nitrogênio sugerem que *PbMLS* está atuando em ambas as vias: no ciclo do glioxalato, quando fontes de 2C são utilizadas, e na via da degradação da alantoína, quando prolina é utilizada como fonte de nitrogênio, ou quando oxalurato é utilizado para induzir os genes da via.



PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

- i. Avaliar a toxicidade de oenoteína B;
- ii. Dosar os polímeros de parede celular de *P. brasiliensis* após exposição à oenoteína B;
- iii. Estudar o mecanismo de ação de oenoteína B em *P. brasiliensis* através da proteômica do fungo na presença do composto;
- iv. Avaliar a efetividade da oenoteína B no tratamento da PCM em modelo animal;
- v. Determinar os parâmetros cinéticos para *Pbmls*;
- vi. Busca por inibidores para *Pbmls*;

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abba S, Balestrini R, Benedeto A, Rottensteiner H, De Lucas JR, Bonfante P 2007. The role of the glyoxylate cycle in the symbiotic fungus *Tuber boechii*: expression analysis and subcellular localization. 52:159-170.
- Achkar JM, Dong Y, Holzman RS, Belisle J, Kourbeti IS, Sherpa T, Condos, R, Rom, WN, Laal S 2006. *Mycobacterium tuberculosis* Malate Synthase- and MPT51-Based Serodiagnostic Assay as an Adjunct to Rapid Identification of Pulmonary Tuberculosis. *Clinical and vaccine immunology*. 13:1291–1293
- Adebajo AC, Oloke KJ, Aladesanmi AJ 1989. Antimicrobial activities and microbial transformation of volatile oils of *Eugenia uniflora*. *Fitoterapia*. 60 (5):451-455.
- Ahmad I, Beg AZ 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*. 74:113-123.
- Albornoz MB 1971. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Saundersia*. 9:248 – 253.
- Alice CB, Vargas VMF, Silva GAAB 1991. Screening of plants used in South Brazilian folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 35:165-171.
- Almeida IC, Neville DC, Mehlert A, Treumann A, Ferguson MA, Previato JO, Travassos LR 1996. Structure of the N-linked oligosaccharide of the main diagnostic antigen of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Glycobiology*. 6(5):507-15.
- Almeida OP, Jacks J Jr, Scully C. 2003. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 14(5):377-83.
- Almeida AJ, Matute DR, Carmona JA, Martins M, Torres I, McEwen JG, Restrepo A, Leão C, Ludovico P, Rodrigues F 2006. Genome size and ploidy of *Paracoccidioides*

brasiliensis reveals a haploid DNA content: flow cytometry and GP43 sequence analysis. *Fungal Genet Biol* 44:25-31.

Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EFA, Smânia Júnior A, Zani CL 2000. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 95:367-373.

Amat AG, Yajía ME 1991. Medicinal plants and ethnopharmacology in the province of Misiones (Argentina). *Acta Farmacêutica Bonaerense*. 10:153-159.

Andrade RV, Paes HC, Nicola AM, de Carvalho MJ, Fachin AL, Cardoso RS, Silva SS, Fernandes L, Silva SP, Donadi EA, Sakamoto-Hojo ET, Passos GA, Soares CMA, Brigido MM, Felipe MS 2006. Cell organization, sulphur metabolism and ion transport-related genes are differentially expressed in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium and yeast cells. *BMC Genomics*. 7:208.

Angely J 1965. Flora analítica do Paraná. São Paulo: USP, p.487-491.

Arango M, Yarzabal L 1982. T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 79:115-23.

Arndt A, Auchter M, Ishige T, Wendisch VF, Eikmanns BJ 2008. Ethanol catabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 15(4):222-33.

Baeza LC, Bailão AM, Borges CL, Pereira M, Soares CMA, Mendes-Gianin MJ 2007. cDNA representational difference analysis used in the identification of genes expressed by *Trichophyton rubrum* during contact with keratin *Microbes and Infection*.

Bagagli E, Franco M, Bosco SMG, Hebel-Barbosa F, Trinca L, Montenegro MR 2003. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol*. 41: 217-23.

- Bagagli E, Bosco SMG, Theodoro RC, Franco M 2006. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Genet Evol.* 6:344-351.
- Bagagli E, Theodoro RC, Bosco SMG, McEwen JG 2007. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia.* 165: 197–207.
- Bailão AM, Schrank A, Borges CL, Dutra V, Molinari-Madlum EEWI, Felipe MSS, Mendes-Giannini MJS, Martins WS, Pereira M, Soares CMA 2006. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: Representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microbes and Infection.* 8:2686-2697.
- Bailão AM, Shrank A, Borges CL, Parente JA, Dutra V, Felipe MSS, Fiúza RB, Pereira M, Soares CMA 2007. The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 51: 43-57.
- Bandoni AL, Mendiondo ME, Rondina RVD, Coussio JD 1972. Survey of Argentine medicinal plants. I. Folklore and phytochemical screening. *Lloydia.* 35:69-80.
- Bastos KP, Bailão AM, Borges CL, Faria FP, Felipe MSS, Silva MG, Martins WS, Fiúza RB, Pereira M, Soares CMA 2007. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol.* 10(7):29.
- Beevers H 1980. The role of the glyoxylate cycle. *The Biochemistry of Plants.* 4:117-130, Academic Press.
- Boekhout T, Renting M, Scheffers AW, Bosboom R 1993. The use of karyotyping in the systematic of yeast. *Antoine van Leeuwenhoek.* 63:157-163.
- Bongaerts GP, Uitzetter J, Brouns R, Vogels GD 1978. Uricase of *Bacillus fastidiosus*: properties and regulation of synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 527:348–358.

- Borges CL, Bailão AM, Bão SN, Pereira M, Parente, Soares CMA 2010. Genes potentially relevant in the parasitic phase of the fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia*.
- Borger-Walmsley MI, Walmsley AR 2000. cAMP signalling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity. *Trends Microbiol.* 3:133-41.
- Branden C and Tooze J 1991. Introduction to protein structure. *Garland Publishing Inc.* New York.
- Braga FG, Bouzada MLM, Fabri RL 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J Ethnopharmacol* 111: 396–402.
- Brownlee, J. M., K. Johnson-Winters, D. H. Harrison, and G. R. Moran. 2004. Structure of the ferrous form of (4-hydroxyphenyl) pyruvate dioxygenase from *Streptomyces avermitilis* in complex with the therapeutic herbicide, NTBC. *Biochemistry* 43:6370–6377.
- Brummer E, Castañeda E, Restrepo A 1993. Paracoccidioidomycosis: an Update. *Microbiol Rev.* 6: 89-117
- Camargo ZP, de Franco MF 2000. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol.* 2:41-8.
- Carrero LL, Niño-Veja G, Teixeira MM, Carvalho MJA, Soares CMA, Pereira M, Jesuino RSA, McEwen JG, Mendoza L, Taylor JW, Felipe MS, San-Blas G 2008. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolates reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fun Gen Biol.* 45:605–612.
- Carrillo-Muñoz AJ, Giusiniao G, Ezkurra PA, Quindós G 2006. Antifungal agents: Mode action in yeast cells. *Rev. Esp. Quimioterap.* 19(2):130 -139.

- Chang YY, Wang AY, Cronan JE Jr 1993. Molecular cloning, DNA sequencing, and biochemical analysis of *Escherichia coli* glyoxylate carboligase. *J Biol Chem* 268, 3911–3919.
- Chen D, Janganan TK, Chen G, Marques ER, Kress MR, Goldman GH, Walmsley AR, Borges-Walmsley MI 2007. The cAMP pathway is important for controlling the morphological switch to the pathogenic yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mol Microbiol.* 65:761-79.
- Clark DP, Cronan JE 1996. Two carbon compounds and fatty acids as carbon sources. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Cellular and Molecular Biology*. p. 343-357.
- Coelho de Souza G, Haas APS, Von Poser GL, Schapoval EES, Elisabetsky E 2004. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J Ethnopharm.* 90:135-143.
- Conti-Diaz, IA 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): 131-140.
- Cooper TG, Gorski M, Turoscy V 1979. A cluster of three genes responsible for allantoin degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 92:383–396.
- Cooper TG 1982. In Strathern, J.N., Jones, E.W., and Broach, J. (ed.), *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 39-99.
- Cooper TG, Chisholm VT, Cho HJ, Yoo HS 1987. Allantoin transport in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by two induction systems. *J. Bacteriol.* 169:4660–4667.
- Corredor GG, Peralta LA, Castano JH, Zuluaga JS, Henao B, Arango M, Tabares AMR, Matute D, McEwen JG, Restrepo A 2005. The naked-tailed armadillo *Cabassous*

- centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Med Mycol.* 43: 275–280.
- Corti M, Palmieri O, Negroni R, Soto I, Villafane MF 2003. Peripleutis due to *Paracoccidioides brasiliensis* in a patient with AIDS. *Medicina.* 63:417.
- Costa M, Borges CL, Bailão AM, Meirelles GV, Mendonça YA, Dantas SF, de Faria FP, Felipe MS, Molinari-Madlum EE, Mendes-Giannini MJ, Fiuza RB, Martins WS, Pereira M, Soares CMA 2007. Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. *Microbiology.* 153:4194-207.
- Coutinho Z, Silva D, Lazera M, Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B 2002. Paracoccidioidomycosis mortality in Brasil 1980-1995. *Cad. Saúde Pública.* 18:1441-1454.
- Coutinho HDM, Costa JGM, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP, Lima EO 2010. Potentiation of antibiotic activity by *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum*. *J. Med. Food.* 13:1024 – 26.
- Cozzone AJ 1998. Regulation of acetate metabolism by protein phosphorylation in enteric bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 52:127–164.
- Da Silva Neto BR, de Fatima da Silva J, Mendes-Giannini MJ, Lenzi HL, de Almeida Soares CM, Pereira M 2009. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. *BMC Microbiol* 9: 272.
- De Almeida SM 2005. Central nervous system paracoccidioidomycosis: an overview. *Braz J Infect Dis.* 9(2):126-33.
- Des Etages SAG, Falvey DA, Reece RJ, Brandriss MC 1996. Functional analysis of the PUT3 transcriptional activator of the proline utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 142:1069–1082.

- De Kruijff B, Demel, RA 1974. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of acholeplasma laidlawii cells and lecithin liposomes. III. Molecular structure of the polyene antibioticcholesterol complexes. *Biochim. Biophys. Acta.* 339, 57-70.
- De Kruijff B, Gerritsen W, Oerlemans A, Demel RA, Van Deenen LLM 1974. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of acholeplasma laidlawii cells and lecithin liposomes. Specificity of the membrane permeability changes induced by the polyene antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta.* 339: 30-43.
- De Morais SM, Craveiro AA, Machado MIL, Alencar JW, Matos FJAJ 1996. The indicated trans stereochemistry is incorrect and should be cis (A. A. Craveiro, private communication). *Essent. Oil Res.* 8:449-451.
- Derengowski LS, Tavares AH, Silva S, Procópio LS, Felipe MS, Silva-Pereira I 2008. Upregulation of glyoxylate cycle genes upon *Paracoccidioides brasiliensis* internalization by murine macrophages and in vitro nutritional stress condition. *Med Mycol.* 46(2):125-34.
- Eastmond PJ, Graham IA Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trend Plant Sci.* 6:72-78.
- El-Shabrawy AO 1995. *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.* 33: 17-21.
- Espinel-Ingroff A 1998. Comparasion of in vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *J Clin Microbiol* 36:2950-6.
- Espinel-Ingroff A 2009. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). *Rev beroam Micol.* 26:15-22.
- Erasco P, Gancedo JM 1984. *Eur. J. Biochem.* 141:195-198.

Fava-Netto C. 1955. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na Blastomicose Sul-Americana com antígenos polissacarídicos. *Arquivos de Cirurgia Clínica Experimental*. 18: 197-254.

Felipe MSS, Andrade RV, Arraes FBM, Nicola AM, Maranhão AQ, Torres FAG, Silva-Pereira I, Poças-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LMP, Andrade PA, Tavares AHFP, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, Pbggenome Network, Pereira M, Jesuino RSA, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS, Barbosa Ms, Martins Nf, Fachin Al, Cardoso Rs, Passos Gas, Almeida Nf, Walter Memt, Soares CMA, Carvalho MJA, Brígido MM 2005a. Transcriptional Profiles of the Human Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in Mycelium and Yeast Cells. *J Biol Chem*. 280:24706-14.

Felipe MS, Torres FA, Maranhao AQ, Silva-Pereira, I Po;Ca-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LMP, Arraes FBM, Carvalho MJA, Andrade RV, Nicola AM, Teixeira MM, Jesuino RSA, Pereira M, Soares CMA, Brígido MMI 2005b. Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 45(3):369-81.

Felipe MSS, Andrade RV, Petrofeza SS, Maranhão AQ, Torres FAG, Albuquerque P, Arraes FBM, Arruda M, Azevedo MO, Baptista AJ, Bataus LAM, Borges CL, Campos EG, Cruz MR, Daher BS, Dantas A, Ferreira MAS, Ghil GV, Jesuino RSA, Kyaw CM, Leitão L, Martins CR, Morais LMP, Neves EO, Nicola AM, Alves ES, Parente JA, Pereira M, Poças-Fonseca MJ, Resende R, Ribeiro BM, Saldanha RR, Santos SC, Silva-Pereira I, Silva MAS, Silveira E, Simões IC, Soares, RBA, Souza D P, De-Souza MT, Andrade EV, Xavier MAS, Veiga HP, Venancio EJ, Carvalho MJA, Oliveira AG, Inoue MK, Almeida MF, Walter MEMT, Soares CMAS, Brígido MM 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast*. 20:263-271.

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

- Ferreira MS, Freitas LS, Lacaz CS, Del Negro GM, Aiello NT, Garcia MN, Assis CM, Salebian A, Heins-Vaccari EM 1990. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from dog food probably contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. *J Med Vet Mycol.* 38:253 – 256.
- Flavell RB, Woodward DO. 1971. Metabolic role, regulation of synthesis, cellular localization, and genetic control of the glyoxylate cycle enzymes in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* 105(1):200-10.
- Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques AS, Dillon NL, Mota NS 1987. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Ver Soc Brás Med Trop.* 20:129-32.
- Franco MF 1987. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol.* 25: 5–18.
- Franco M, Sano A, Kera K, et al 1989. Chlamydospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 31(3)151-7.
- Fraenkel DG 1982. In Strathern, J.N., Jones, E.W., and Broach, J. (ed.), *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 1-37.
- Faganello J, Dutra V, Schrank A, Meyer W, Schrank IS, Vainstein MH. 2009 Identification of genomic differences between *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by Representational Difference Analysis (RDA). *Med Mycol.* 47(6):584-91.
- Fagundes-Pereyra WJ, Carvalho GT, Góes AM, das Chagas Lima e Silva F, de Sousa AA 2006. Central nervous system paracoccidioidomycosis: analysis of 13 cases. *Arq. Neuropsiquiatr* 64:269-76

- Funatogawa K, Hayashi S, Shimomura H, Yashida T, Hatano T, Ito H, Hirai Y 2004. Antibacterial Activity of Hydrolyzable Tannins Derived from Medicinal Plants against *Helicobacter Pilory*. *Microbiol Immunol*. 48: 251-261.
- García AM, Hernández O, Aristizabal BH, Bernardes LAS, Puccia R, Naranjo TW, Goldman GH, Goldman MH, Cano LE, Restrepo A, Mcewen JG 2009. Gene expression analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* transition from conidium to yeast cell. *Med Mycol*. 48(1):147-54.
- Gargano S, Di Lallo G, Kobayashi GS, Maresca B 1995. A temperature-sensitive strain of *Histoplasma capsulatum* has an altered delta 9-fatty acid desaturase gene. *Lipids* 30:899-906.
- Gaudy ET, Bojanowski R, Valentine RC, Wolfe RS 1965. Ureidoglycolate synthetase of *Streptococcus allantoicus*. I. Measurement of glyoxylate and enzyme purification. *J Bacteriol*. 90: 1525_1530.
- Georgopapadakou NH, Walsh TJ 1996. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob. Agents Chemother*. 40: 279-291.
- Gesuele E 1989. Aislamento de *Paracoccidioides* sp de heces de pinguino de la Antártida. In: Proceedings of the 4th International Meeting on Paracoccidioidomycosis. Caracas, Venezuela. Abstrat B2.
- Goldman GH, Dos Reis EM, Ribeiro DCD, De Souza LAB, Quiapin AC, Vitorelli PM, Savoldi M, Semighini CP, De Oliveira RC, Nunes LR, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Ferreira LE, Moreira JC, Bogossian AP, Tekaia F, Nobrega MP, Nobrega FG, Goldman MH 2003. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryot Cell*. 2: 34-48.

- Graham JE, Clark-Curtiss JE 1999. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 11554–11559.
- Grose E, Tamsitt JR 1965. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia. *Saubouraudia.* 4:124–125.
- Hallack J, San-Blas F, San-Blas G 1982. Isolation and wall analysis of dimorphic mutants of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia.* 20:51-62.
- Hahn Rc, Morato Conceição Yt, Santos Nl, Ferreira Jf, Hamdan Js 2003. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and *in vitro* resistance to ketoconazole e trimethoprim sulphamethoxazole. *Mycoses.* 46: 403-407
- Hamdan JS, Rocha RL 1987. Epidemiologia da paracoccidioidomicose. *An Fac Med Univ Fed.* 35:52-61.
- Hamel RD, Appana VD 2001. Modulation of TCA cycle enzymes and aluminum stress in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 87:1-8.
- Harbone J 1999. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochem. Syst Ecol.* 27: 335-367.
- Hartig A, Simon MM, Schuster T, Daughert JR, Yoo HS, Cooper T G 1992. Differentially regulated malate synthase genes participate in carbon and nitrogen metabolism of *Saccharomyces crevisiae*. *Nucleic Acids Re.* 20:5677-5686.
- Hatano T, Yasuhara T, Matsuda M, Yazaki K, Yoshida T, Okuda T 1990. *J Chem Soc, Perkin Transactions I,* 2735.
- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Filho BPD 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97:1027-1031.

- Hong YL, Hossler PA, Calhoun DH, Meshick SR 1995. Inhibition of recombinant *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthetase by sulfa drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1756 – 1763.
- Howard BR; Endrizzi JA; Remington J 2000. Crystal structure of *Escherichia coli* malate synthase G complexed with magnesium and glyoxylate at 2.0 Å resolution: Mechanistic Implications. *Biochemistry*. 39:3156–3168.
- Hubank M, Schatz AG 1994. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res*. 22:5640.
- Hull EP, Green PM, Arst HN, Scazzocchio C 1989. Cloning and characterization of the L-proline catabolism gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol*. 3:553–560.
- Idnurm A, Howlett BJ 2002. Isocitrate lyase is essential for pathogenicity of the fungus *Leptosphaeria maculans* to canola (*Brassica napus*). *Eukar Cell*. 2002 1(5):719-24.
- Inokuchi J, Okabe H, Yamauchi T, Nagamatsu A, Nonaka G, Ishioka I 1985. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme in crude drugs. *II Chem Pharm Bull*. 33: 264-269.
- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis 2003. IBAMA conclui mapeamento das ecorregiões brasileiras, Brasília, Brasil.
- Keilin J 1959. The biological significance of uric acid and guanine excretion. *Biol. Rev*. 34:265–296.
- Kelly SL, Arnoldi A, Kelly DE 1993. Molecular genetic analysis of azole antifungal mode of action. *Biochemical Society transactions*. 21:1034-1038.
- Kornberg HL, Krebs HA 1957. *Nature*. 199: 988.
- Kornberg HL, Beevers H 1957. A mechanism of conversion of fat to carbohydrate in castor beans. *Nature*. 180: 988.

- Kornberg HL 1966. The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochem.* 99: 1.
- Kricmery VC Jr 2005. Antifungal chemoterapeutics. *Med Print Pract.* 14: 125-135.
- Kunze M, Kragler F, Binder M, Hartig A, Gurvitz A 2002. Targeting of malate synthase 1 to the peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae* cells depends on growth on oleic acid medium. *Eur. J. Biochem.* 269: 915-922
- Lacaz CS 1994. Novos dados em relação à blastomicose sul americana e o seu agente etiológico. *Rev. Med. Cir.* 9:303-340.
- Lacaz CS, Vidal MS, Heins-Vaccari EM, De Melo NT, Del Negro GM, Arriagada GL, Freitas RDOS 1999. *Paracoccidioides brasiliensis*. A mycologic and immunochemical study of two strains. *Rev Inst Med Trop.* 41:79 - 86.
- Lattif AA, Prasad R, Banerjee U, Gupta N, Mohammad S, Baquer NZ 2006. The glyoxylate cycle enzymes activities in the pathogenic isolates of *Candida albicans* obtained from HIV/AIDS, diabetic and burn patients. *Mycoses.* 49:85-90.
- Leclerc MC, Philipe H, Guého E 1994. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J Med Vet Mycol.* 32:331-341.
- Lee MH, Nishimoto S, Yang LL 1997. Two macrocyclic hydrolysable tannins dimmers from *Eugenia uniflora*. *Phytochemistry.* 44:1343-1349.
- Lee MH, Chiou JF, Yen KY, Yang LL. 2000. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. *Cancer Letters.* 154, 131-136.
- Lengeler KB, Davidson , D'souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P, Pan X, Waugh M, Heitman J 2000. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64:746-85.

Lesuisse D, Berjonneau J, Ciot C, Devaux P, Doucet B, Gouvest JF, Khemis B, Lang C, Legrand R, Lowinski M, Maquin P, Parent A, Schoot B, Teutsch G. 1996. Determination of Oenothain B as active 5- α -reductase-inhibiting principle of the folk medicine *Epilobium parviflorum*. *Journal Natural Products*. 59: 490-492.

Lisitsyn NA 1995 *Trends Genet*. 11:303–307.

Liu F, Thatcher JD, Barral JM Epstein HF 1995 Bifunctional glyoxylate cycle protein of *Caenorhabditis elegans*: a developmentally regulated protein of intestine and muscle. *Dev. Biol*. 169:399-414.

Lock EA; Ellis MK; Gaskin P; Robinson M; Auton TR; ProvanWM; Smith LL; Prisbylla MP; Mutter LC, Lee DL 1998. From toxicological problem to therapeutic use: the discovery of the mode of action of 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione (NTBC), is toxicology and development as a drug. *J. Inherit. Metab. Dis*. 21: 498-506.

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

Lorenz MC, Fink GR 2001. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature*. 412(6842):83–86.

Lorenz MC, Fink GR 2002. Life and death in a macrophage: Role oh the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryotic Cell*. 1:(5):657-662.

Lutz A 1908. Uma micose pseudo-coccidíca localizada na boca e observada no Brasil: Contribuição ao conhecimento das hiphoblastomicoses americanas. *Brasil Méd*.22: 121–124.

- Maluf MLF, Takahachi g, Svidzinski TIE, Xander P, Apitz-Castro R, Bersani-Amado CA, Cuman RKN 2008. Antifungal activity of ajoene on experimental murine paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol.* 25: 163-166.
- Marques AS 2003. Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. *Na Brás Dermatol.* 73(2):135-50.
- Marques ER, Ferreira MES, Drummond RD, Felix JM, Menossi M, Savoldi M, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Carvalho KC, Goldman MHS, Goldman GH 2004. Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. *Mol. Gen. Genomics.* 271:667-677.
- Marques SA 1998. Paracoccidioidomicose. *An Bras Dermatol.* 73(5):455-69
- Marzluf GA 1997. Genetic Regulation of Nitrogen Metabolism in the Fungi. *Microbiology and Molecular biology reviews.* 1(61):17–32.
- Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Monte BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT, Restrepo A, Morais F, Niño-Veja G, Taylor JW 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol.* 23:65-73.
- McEwen JG, Bedoya V, Patino MM, Salazar ME, Restrepo A 1987. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Micol.* 25: 165–175.
- McEwen JG, Garcia AM, Ortiz BL, et al 1995. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res.* 26(3):305-6.
- Mendes RP 1994. The gamut of clinical manifestations. In Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del-Negro G eds. *Paracoccidioidomycosis*, 1st edn. Boca Raton: CRC Press. Pp 233-258.

- Minard KI, Mcalister-Henn L 1991. Isolation, nucleotidesequenceanalysis, and discription of the MDH2 gene from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for three isoenzymes of yeast malate dehydrogenase. *Mol. Cell. Biol.*11(1):370–380.
- Miyaji M, Kamei K 2003. Imported mycoses: an update. *J Infect Chemother* 9:107-13.
- Molina I; Pellicer MT; Badia J; Aguilar J; Baldoma L 1994. Molecular characterization of *Escherichia coli* malate synthase G. Differentiation with the malate synthase A isoenzyme. *Eur. J. Biochemistry.* 224:541-548.
- Molinari-Madlum EE, Felipe MS, Soares CM 1999. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Med Mycol.* 37:269-76.
- Moudgal V, Sobel J 2010 Antifungals to treat *Candida albicans*. *Expert Opin Pharmacother.* 11:2037-48.
- Munro CA, Gow NAR 2001. Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med Mycol.* 39:41-53.
- Munir, E.; Takefumi, H.; Mikio, S. (2002) Purification and Characterization of Malate Synthase from the Glucose-grown Wood-rotting Basidiomycete *Fomitopsis palustris*. *Biosci., Biotechmol., Biochem.* **66**:576-581.
- Nakai T, Uno J, Ikeda F, Tawara S, Nishimura K, Miyaji M 2003. *In vitro* antifungal activity of micafungin (FK463) against dimorphic fungi: comparison of yeast-like and mycelial forms. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:1376- 1381.
- Nakazawa M, Minami T, Teramura K, Kumamoto S, Hanato S, Takenaka S, Ueda M, Inui H, Nakano Y, Miyatake K 2005. Molecular characterization of a bifunctional glyoxylate cycle enzyme, malate synthase/isocitrate lyase, in *Euglena gracilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 141:445-452.

Napolitano DR, Mineo JR, De Souza MA, De Paula JE, Espindola LS, Espindola FS 2005. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. *J Ethnopharm.* 99: 37-41.

National Committee For Clinical Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard, 2nd ed. M27-A2. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.39.

Negróni P 1966. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprotíficamente en el suelo Argentino. *Prensa Med Argent.* 53:2381–2382.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *J Nat Prod.* 66:1022-1037.

Nogales J, Guijo MI, Quesada A, Merchán F 2004. Functional analysis of the malate synthase from *Clamydomonas reinhardtii*. *Planta.* 219:325-331.

Nunes LR; Oliveira RC; Leite DB; Silva VSS; Marques ER; Ferreira MES; Ribeiro DCD; Bernardes LAS; Goldman MHS; Puccia R; Travassos LR; Batista WL; Nóbrega MP; Nobrega FG; Yang DY; Pereira CAB, Goldman GH 2005. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryotic Cell.* 4(12):2115-2128.

Nygaard P 1983. Utilization of preformed purine bases and nucleosides, p.27– 93. In A. Munch-Petersen (ed.), *Metabolism of nucleotides, nucleosides and nucleobases in microorganisms.* Academic Press, London, U.K.

Odds FC, Brown AJP, Gow NAR 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 11:272-279.

Olivas I, Royuela M, Romero B, Monteiro MC, Mínguez JM, Laborda F, De Lucas JR. 2007. Ability to grow on lipids accounts for the fully virulent phenotype in neutropenic mice

of *Aspergillus fumigatus* null mutants in the key glyoxylate cycle enzymes, *Fungal Genet.Biol.* 45:45-60.

Ornston LN, Ornston MK (1969) Regulation of glyoxylate metabolism in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 98: 1098-1108.

Paniago AM, de Freitas AC, Aguiar ES, Aguiar JI, da Cunha RV, Castro AR, Wanke B 2005. Paracoccidioidomycosis in patients with human immunodeficiency virus: review of 12 cases observed in an endemic region in Brazil. *J Infect.* 3:248-52.

Pauli A 2006. Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. *Med Res Rev.* 26:223-68.

Park JB, Chae HZ, Kim YS 1986 Purification and characterization of malate synthase from *Acinetobacter calcoaceticus* grown on malonate. *Korean Biochem. J.* 19:235-241.

Pasqualotto AC, Denning DW. 2008 New and emerging treatments for fungal infections. *J Antimicrob Chemother.* 61 Suppl 1:i19-30.

Pastorian K, Havell III L, Byus CV 2000. Optimization of cDNA Representational Difference Analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. *Anal Biochem.* 283:89-98

Pereira M, Song Z, Santos-Silva LK, Richards MH, Nguyen TT, Liu JL, Soares CMA, Cruz AHS, Ganapathy K, Nes WD 2010 Cloning, Mechanistic and Functional Analysis of a Fungal Sterol 24C- Methyltransferase Implicated in Brassicasterol Biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1801:1163-1174.

Perez C, Anesini C 1994. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by Argentinian medicinal plants. *Fitoterapia.* 65 (2):169-172.

- Porcu OM, Rodriguez-Amaya DB 2008. Variation in the carotenoid composition of the lycopene-rich brazilian fruit *Eugenia uniflora* L. *Plant Foods Hum Nutr.* 63:195–199.
- Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Tabora CP 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* 3:513-21.
- 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.
- Ram AF, Arentshorst M, Damueld RA, VanKuyk PA, Klis FM, van den Hondel CAMJJ 2004. The cell wall stress response in *Aspergillus niger* involves increased expression of the glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase-encoding gene (gfaA) and increased deposition of chitin in the cell wall. *Microbiology.* 150:3315-3326.
- Ramos-e Silva MD, Saraiva LES 2008. Paracoccidioidomycosis. *Dermatol Clin.* 26:257-269.
- Rehder VG; Machado ALM; delarmelina C; Sartoratto A; Duarte MCT; Figueira GM 2004. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de duas espécies de *Origanum*. *Ver Bras Plant Med* 6: 67-71.
- Reinscheid DJ, Eikmanns BJ, Sahm H 1994. Malate synthase from *Corynebacterium glutamicum*: sequence analysis of the gene and biochemical characterization of enzyme. *Microbiology.* 40:3099-3108.
- Ratera EE, Ratera MO 1980. Plantas de la Flora Argentina empleadas en Medicina Popular. Hemisferio Sur, Buenos Aires, pp. 128–129.
- 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: 323-34.
- Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover P, Feldman D, Stevens DA 1984. Estrogens inhibit mycelium to yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: Implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immunol*, 46(2):346-353.
- Restrepo A, Benard G, de Castro CC, Agudelo CA, Tobón AM 2008. Pulmonary paracoccidioidomycosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2:182-97.
- Ribeiro LC, Hahn RC, Favalessa OC, Tadano T, Fontes CJ 2009. Systemic mycosis: factors associated with death among patients infected with the human immunodeficiency virus, Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil, 2005-2008. *Rev Soc Bras Med Trop*. 426:698-705.
- Richini-Pereira VB, Bosco SDE M, Griese J, Theodoro RC, Macoris SA, Da Silva RJ, Barrozo L, Tavares PM, Zancopé-Oliveira RM, Bagagli E. 2008. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol*. 46: 35-40.
- Rivitti EA, Aoki V 1999. Deep fungal infections in tropical countries. *Clin Dermatol* 17:171-90.
- Rodrigues EG, Dobroff AS, Taborda CP, Travassos LR 2009 Antifungal and antitumor models of bioactive protective peptides. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 1:503-520.
- Rude TH, Toffaletti DL, Cox GM, Perfect JR 2002. Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoforms*. *Infect. Immun*. 70:(10):5684 – 5694.
- Salazar M E. Restrepo A, Stevens DA. 1988. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect. Immun*. 56:711–713.

- San-Blas G, Urbina JA, Marchán E, Contreras EM, Sorais F, San-Blas F 1997. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene is associated with blockade of phosphatidylcholine biosynthesis. *Microbiology* 143 1997:1583-1586.
- San-Blas G, Niño-Vega G 2007. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. *Mycopathologia*. 165: 183-195.
- Sanglard, D 2002. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Current Opinion Microbiology*. 5:379-385.
- San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol*. 40:225 – 242.
- San-Blas G, Niño-Vega G. 2001. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In R. L. Cihlar and R. A. Calderone (ed.), *Fungal pathogenesis: principles and clinical applications*, Marcel Dekker, Inc. New York, N.Y. pp.205-226.
- Santos GD, Ferri PH, Santos SC, Bao SN, Soares CMA, Pereira M 2007. Oenothelin B inhibits the expression of PbFKS1 transcript and induces morphological changes in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 45(7):609-618.
- Santos Pimenta, LP, Pinto GB, Takahashi JA, Silva LG, Boaventura MA 2003. Biological screening of annonaceous Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* brine shrimp test. *Phytomedicine*. 10: 209-212.
- Santos-Buelga C, Scalbert A 2000. *J Sci Food Agric* 80:1094-1117.
- Schikarski M 1976. *Über die Inhaltsstoffe von Stenocalys michelii* (Lam.) Berg (Myrtaceae) Munster, Universität Munster, Ph.D. Thesis, pp. 148.

Septímio LR 1994. A fitoterapia baseada em ervas medicinais do Cerrado. SIPE, Ministério da Cultura, Brasília.

Shikanai-Yasuda MA, Queiroz-Telles F, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML 2006. Consenso em Paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 39(3):297-310 [in Portuguese].

Shome SK, Batista AC 1963. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife, Brazil. *Rev Fac Med Univ Fed Ceará.* 3:90 – 94.

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

Silva SP, Borges-Walmsley MI, Pereira IS, Soares CMA, Walmsley AR, Felipe MSS 1999. Differential expression of an hsp70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Molecular Microbiology.* 31(4):1039–1050.

Silva-Vergara ML, Martínez R, Chadu A, Madeira M, Freita-Silva G 1998. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil a coffee plantation in Ibiá, State of Mina Gerais, Brazil. *Med Mycol.* 36:37–42.

Silvestre MT, Ferreira MS, Borges AS, et al 1997. Monoartrite de joelho como manifestação isolada de paracoccidioidomicose. *Ver Soc Brás Med Trop.* 30(5):393-5.

Srivastava M, Akhoun BA, Gupta SK, Gupta SK 2010. Developmente of resistance against blackleg disease in *Brassica oleracea var. botrytis* through *in silico* methods. *Fungal Genetics and Biology.*

Sophianopoulou V, Scazzocchio C 1989. The proline transport protein of *Aspergillus nidulans* is very similar to amino acid transporters of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 3:705–714.101

Souza LKH, Oliveira, CMA, Ferri PH *et al* 2002. Antifungal properties of Brazilian Cerrado plants. *Braz J Microb.* 33:247-249.

Srivastava RC, Husain MM, Hasan SK, Athar M 2010. *Cancer Lett.* 153:1-5.

Stevens DA 1989. The interface of mycology and endocrinology. *J. Med. Vet. Mycol* 27:133-140.

Suyenaga ES, Reche E, Farias FM, Schapoval EE, Chaves CG, Henriques AT
Antiinflammatory investigation of some species of Mikania. 2002. *Phytotherapy Research.* 16: 519-523.

Szabo AS, Avers CJ 1969 Some aspects of regulation of peroxisomes and mitochondria in yeast. *Ann NY Acad Sci.* 19: 302-312.

Taniguchi S, Nakamura N, Nose M, Takeda S, Uchi-Y R, Ito H, Yoshida T, Yazaki K 1998. Production of macrocyclic ellagitannin oligomers by *Oenothera lacinata* callus cultures. *Phytochemistry.* 48: 981-985.

Tavares AH, Silva SS, Dantas A, Campos EG, Andrade RV, Maranhão AQ, Brígido MM, Passos-Silva DG, Fachin AL, Teixeira SM, Passos GA, Soares CM, Bocca AL, Carvalho MJ, Silva-Pereira I, Felipe MS 2007. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbes Infect.* 5:583-90.

Teixeira MM, Raquel CT, Carvalho MJA, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, Mendoza L, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MSS 2009. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 273–283

- Theodoro RC, Candeias JMG, Araújo JP Jr, Bosco SMG, Macoris SAG, Padula LO Jr, Franco M, Bagagli E 2005. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol.* 43(8):725-9.
- Theodoro RC, Bagagli E, Oliveira C. 2008. Phylogenetic analysis of PRP8 intein in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. *Fungal Genetics and Biology* 45: 1284–1291.
- Thomaz L, Apitz-Castro R, Marques AF, Travassos LR, Taborda CP 2008 Experimental paracoccidioidomycosis: alternative therapy with ajoene, compound from *Allium sativum*, associated with sulfamethoxazole/trimethoprim. *Med Mycol.* 46:113-8.
- Travassos LR, Taborda CP, Colombo AL 2008. Treatment options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. *Expert review of anti-infective therapy.* 6:251-262.
- Tugarinov V, Muthandiram R, Ayed A, Kay LE 2002. Four-dimensional NMR Spectroscopy of a 723-residue protein: chemical shift assignments and secondary structure of malate synthase. *J. Am. Chem. Soc.* 124:10025–10035.
- Vale ACF, Guimarães RR, Lopes DJ, et al 1992. Aspectos radiológicos torácicos na paracoccidioidomicose. *Ver Inst Med Trop São Paulo.* 34:107-15.
- Vogels GD, Drift VD 1976. Defradation of purines and pyrimidines by microorganisms. *Bacteriological review* 40(2):403-468.
- Villar LA, Salazar ME, Restrepo A 1988. Morphological study of a variant of *Paracoccidioides brasiliensis* that exists in the yeast form at room temperature. *J Med Vet Mycol.* 26:269-276.
- Visbal G, Alvarez A, Moreno B, San-Blas G. 2003 S-Adenosyl-L-methionine inhibitors delta(24)-sterol methyltransferase and delta(24(28))-sterol methylreductase a possible

agents against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:2966-70.

Visbal G, San-Blas G, Murgich J, Franco H 2005. *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomycosis, and antifungal antibiotics. *Curr Drug Targets: Infect Disord* 5:211-26.

Wanchu A, Dong Y, Sethi S, Myneedu VP, Nadas A, 2008 Biomarkers for Clinical and Incipient Tuberculosis: Performance in a TB-Endemic Country. *PLoS ONE* 3(4): 2071.

Watanabe S, Takada Y, Fukunaga N 2001. Purification and characterization of a cold-adapted isocitrate lyase and malate synthase from *Colwellia maris*, a psychrophilic bacterium. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:1095-1103.

Weyerstahl P, Marschall-Weyerstahl H, Christiansen C, Oguntimein BO, Adeoye AO 1988. *Planta Med.* 54:546-549.

Wohler F 1853. Gahrung des Allantoins. *Ann. Chem. Pharm.* 88:100-101.

Woodcock E, Merrett MJ 1978. Purification and immunochemical characterization of malate synthase from *Euglena gracilis*. *Biochem. J.* 173:95-101.

Wu XW, Lee CC, Muzny DM, Caskey CT 1989. Urate oxidase: primary structure and evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:9412–9416.

Xu S, Falvey DA, Brandriss M 1995. Roles of *URE2* and *GLN3* in the proline utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology.* 15(4):2321-30.

Yi t D, Yi t, zgen U 2008. An investigation on the anticandidal activity of some traditional medicinal plants in Turkey. *Mycoses* 52:135–140.

Zehavi U, Polacheck I. 1996 Saponins as antimycotic agents: glycosides of medicagenic acid. *Adv Exp Med Biol.* 404:535-46.

Colaborações científicas durante o doutorado

- 1) **Projeto:** Estratégias Genômicas e Proteômicas na elucidação do perfil transcricional de *Paracoccidioides brasiliensis* em resposta à itraconazol e anfotericina B.

Projeto de doutorado desenvolvido pelo aluno Benedito Rodrigues da Silva Neto, no Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás.

Coordenador: Prof^a. Dra. Maristela Pereira.

Colaboração: Patrícia Fernanda Zambuzzi Carvalho – desenvolvimento das bibliotecas subtrativas, sequenciamento, anotação das ESTs obtidas e análises de PCR em Tempo Real.

- 2) **Projeto:** Perfil transcricional de *Paracoccidioides brasiliensis* em resposta à sulfametoxazol

Projeto de mestrado desenvolvido pela aluna Amanda Gregorim Fernandes, no Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás.

Coordenador: Prof^a. Dra. Maristela Pereira.

Colaboração: Patrícia Fernanda Zambuzzi Carvalho – desenvolvimento das bibliotecas subtrativas, sequenciamento, anotação das ESTs obtidas e análises de PCR em Tempo Real.

- 3) **Projeto:** Aplicação de tecnologias genômicas no melhoramento do feijoeiro comum visando à identificação de genes candidatos e mapeamento de locos associados ao estresse hídrico e à murcha de *Curtobacterium*.

Projeto desenvolvido no Laboratório de Melhoramento Genético, EMBRAPA - GO.

Coordenador: Prof^a. Dra. Rosana Pereira Vianello Brondani.

Colaboração: Patrícia Fernanda Zambuzzi Carvalho – desenvolvimento das bibliotecas subtrativas.



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

NORMA – CPGMTSP N° 04/2009

**NORMAS PARA ELABORAÇÃO DE DISSERTAÇÃO E DE TESE PARA OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE MESTRE OU DE DOUTOR**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE TÍTULO DE MESTRE: MODALIDADE
CLÁSSICA**

1. Preâmbulo (Anexo I): Capa e Contracapa; catalogação bibliográfica segundo regras da UFG; dedicatória, agradecimentos; Sumário; Lista de tabelas, figuras e anexos incluindo a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa onde a pesquisa foi desenvolvida; Lista das siglas, símbolos e abreviaturas; Resumo; Abstract.

2. Corpo da Dissertação

1. Introdução/revisão da literatura sobre o tema;
2. Justificativa,
3. Objetivos;
4. Métodos;
5. Resultados;
6. Discussão;
7. Conclusões;_
8. Recomendações (se pertinentes);_
9. Referências Bibliográficas segundo normas do periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz
10. Anexos

OBS: É obrigatório anexar pelo menos um artigo/ manuscrito referente a dissertação (a ser submetido, submetido, aceito ou publicado) na íntegra no item Anexos.

**TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR: MODALIDADE ARTIGOS
CIENTÍFICOS**

As Teses de Doutorado devem ser apresentadas na forma de artigos científicos incluindo dois ou mais artigos/ manuscritos publicados/aceitos/submetidos a periódicos internacionais indexados no JCR, sendo pelo menos um artigo em periódico com fator de impacto 1.1. Excepcionalmente poderá ser aceito um único artigo para doutorado de acordo com os critérios de avaliação da CAPES para a área de Medicina II. O

doutorando deverá ser o primeiro autor, em pelo menos um dos artigos, que devem pertencer a uma única linha de pesquisa ou a temas relacionados.

1. Preâmbulo (Anexo II): Capa e Contracapa; catalogação bibliográfica segundo regras da UFG; membros da banca examinadora; dedicatória, agradecimentos; Sumário; Lista de tabelas, figuras e anexos incluindo a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa onde a pesquisa foi desenvolvida; Lista das siglas, símbolos e abreviaturas; Resumo; Abstract e Apresentação da trajetória do candidato até o doutorado (opcional).

2. Corpo da Tese

1. Introdução/revisão da literatura sobre o tema;
Artigo(s) de revisão sistemática sobre o tema da tese pode(m) substituir a introdução de revisão clássica da literatura
2. Justificativa,
3. Objetivos;
4. Métodos (opcional);
5. Resultados
Artigos científicos (submetidos, aceitos ou publicados) redigidos segundo as normas de cada periódico selecionado;
6. Discussão objetiva geral dos principais resultados dos artigos apresentados;
7. Conclusões;_
8. Recomendações (se pertinentes);_
9. Referências Bibliográficas da tese segundo normas do periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Serão considerados artigos científicos: Artigo completo, Relato Preliminar/ Comunicação Concisa ou Carta ao Editor (no máximo uma carta ao editor por tese quando for o caso).

FORMATACÃO:

Qualquer que seja a modalidade, o produto final apresentado ao PPGMTSP deverá ser preparado de acordo com as seguintes especificações: Papel A4; espaçamento entre linhas: 1,5; fonte: Times New Roman tamanho 12; margem superior = 2,5cm margem inferior = 2,5cm , à direita = 3,0cm e à esquerda = 3,0cm.

Impressão final - deverá ser encadernada em capa dura – cor preta com letras douradas.

Estas normas foram aprovadas em reunião extraordinária da CPG do dia 18/09/2009 e serão aplicadas aos alunos que ingressarem no PPGMTSP a partir de Março de 2010.

Prof. Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública do IPTSP/UFG

Goiânia, 21 de setembro de 2009.