

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Luciana Márcia de Oliveira

BIOLOGIA DE SISTEMAS NO ESTUDO DO DIMORFISMO TÉRMICO:

- UMA ISOLADO DE *Paracoccidioides brasiliensis*

ATÍPICO NA MORFOGÊNESE

Belo Horizonte, agosto/2016

Luciana Márcia de Oliveira

**BIOLOGIA DE SISTEMAS NO ESTUDO DO DIMORFISMO TÉRMICO:
- UMA ISOLADO DE *Paracoccidioides brasiliensis*
ATÍPICO NA MORFOGÊNESE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioinformática do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioinformática.

Orientadora

Prof. Dra. Patrícia Silva Cisalpino - Depto. de Microbiologia - UFMG

Colaboradores

Dra. Christina Cuomo – Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard, USA e Dr. Jeronimo C. Ruiz – Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) Fiocruz-Minas

Belo Horizonte - UFMG/ 2016

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais pelo amor incondicional, apoio e pela minha formação como ser humano. Aos que contribuíram para a minha evolução pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

À professora Patrícia pelas orientações e ensinamentos. Obrigada pela amizade, paciência, apoio e pelos vários momentos de descontração no seu gabinete, discutindo ciência, culinária, política e democracia. Obrigada pela confiança.

Ao Grupo Informática de Biossistemas e Genômica da Fiocruz-Minas, em especial ao Dr. Jeronimo e Leilane, o meu obrigada pela colaboração, apoio ao projeto, pela estrutura computacional durante o desenvolvimento do trabalho e pelas discussões científicas.

Ao Grupo Genômica de Fungos do Broad Institute of MIT and Harvard, em especial à Dra. Christina Cuomo, pela oportunidade da realização do doutorado sanduiche, pela colaboração com o trabalho, apoio computacional, orientação e discussões científicas.

Ao Dr. Guilherme Oliveira do Instituto Tecnológico Vale pelas oportunidades científicas valiosas que sempre me dispôs ao longo da minha formação.

Ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), UFMG, pela hospitalidade durante a realização desse projeto, em especial aos professores Daniele da Glória, Viviane Alves e Luiz Rosa.

Às agencias de fomento CAPES pela bolsa de doutorado, à FAPEMIG pelo financiamento do meu projeto de doutorado (APQ-01350- 12) e ao CNPq.

Aos amigos e colegas do ICB (UFMG) e da Fiocruz-Minas pelas colaborações, convívio agradável, amizade, trocas científicas, discussões e aprendizado. Em especial meu muito obrigada a Leilane, Marliete, Heliana, Vanessa, Grace e Fernanda.

Aos meus pais e irmãos, obrigada pela união, estrutura e pelo apoio, amo vocês.

Ao Jeronimo pelas oportunidades de crescimento, pelo amor, por ter sido companheiro em momentos importantes da minha vida e pelos anos de convívio.

Aos *amigos para sempre*, obrigada pela amizade verdadeira, apoio e pelos momentos de “desanuviamiento” regados a boas cervejas e muita gargalhada: Mickey, Milena, Marliete, Cris, Tchururu, Fer, Café, Tati, Carol.

Por fim, à todos que contribuíram de alguma forma com o meu crescimento e evolução nessa jornada.

“É chamado de espírito livre aquele que pensa de modo diverso do que se esperaria com base em sua procedência, seu meio, sua posição e função, ou com base nas opiniões que predominam em seu tempo. Ele é exceção, os espíritos cativos, a regra; [...] De resto, não é próprio da essência do espírito livre ter opiniões mais corretas, mas sim ter se libertado da tradição, com felicidade ou com um fracasso. Normalmente, porém, ele terá ao seu lado a verdade, ou pelo menos o espírito da busca da verdade: ele exige razões...”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

A Paracoccidioidomicose, micose sistêmica endêmica na América Latina, é causada pelos fungos termodimórficos do complexo Paracoccidioides. A doença é contraída por inalação de conídios infectantes que, à temperatura corpórea (37°C), desencadeiam a transição morfogênica desenvolvendo-se formas de leveduras (L). A partir do isolado de *P. brasiliensis* Pb339 (ATCC32069), sob pressão seletiva de 400 µg/mL da droga sulfametoxazol, selecionou-se um isolado defeutivo no dimorfismo térmico (YRT, Yeast at Room Temperature). À temperatura ambiente (TA), inclusive na ausência da droga, o isolado YRT cresce como uma massa cerebriforme bege. Células L grumadas, 1 a 3 brotamentos, ovóides, irregulares e catenuladas, sugestivas de pseudo-hifas, foram registrados à microscopia ótica e eletrônica (varredura e transmissão). Diferente da maioria dos isolados de *P. brasiliensis* que são facilmente removíveis da superfície do meio de cultivo a 37°C, se adere fortemente. O isolado YRT sobreviveu ao desafio de infecção em camundongos, sendo recuperado do lavado pulmonar mantendo fenótipo atípico L à TA; induziu aumento e acúmulo significativo ($P < 0,05$) de neutrófilos, porém, menor acúmulo de macrófagos que o controle. Em Ágar YPD (0.1% ou ausência D-glucose) e em meio mínimo observou-se reversão para a forma micelial (M) à TA e ausência de crescimento a 37°C. Os níveis de quitina no isolado atípico foram menores ($p < 0,05$) do que nos controles L, porém, maiores que nas formas M. A 37°C e sob a pressão da droga, apresentou níveis maiores ($p < 0.05$) de derivado reativos de oxigênio (ROS) que nos controles. Pela primeira vez aplicou-se a tecnologia de sequenciamento de RNA, RNASeq (Next-generation sequencing – Illumina), para investigar o transcrito dos estágios L e M do isolado Pb339 e do isolado atípico YRT. Foram obtidas 5x10⁸ leituras (PE 2x100, Q Phred ≥ 25), das quais 3,2x10⁸ mapeadas para o genoma de referência Pb18. Os valores estimados de FPKM das réplicas biológicas apresentaram-se positivamente correlacionados. As fases L e M do isolado Pb339 possuem transcritomas distintos, apresentando, respectivamente, 248 e 802 genes diferencialmente expressos. As vias de estresse oxidativo foram as mais enriquecidas. A 37°C os isolados YRT e Pb339 apresentaram perfil transcricional similar, envolvendo 462 genes regulados positivamente. O transcrito do isolado defeutivo YRT, à TA, mostrou-se alterado drasticamente quando comparado à fase M do isolado de referência. Identificaram-se 387 genes diferencialmente expressos no YRT quando comparado à fase M (Pb339). As vias oxidativas e de síntese de proteínas foram as mais representativas; observou-se super-representação dos genes com a função co-factor de ligação, transportadores ABC e das vias de sinalização das quinases. Identificaram-se 125 variantes genéticas (SNP/Indel) no isolado YRT, dos quais 2 associados a substituições não sinônimas (genes da MAPK3 e TAO3/PAG1, envolvidos na regulação do crescimento micelial de fungos patogênicos.) e 4 com perda de função, destacando-se o gene codificador da proteína USP, (universal stress protein) e um gene hipotético contendo regiões repetitivas de tetratricopeptídeos e domínios de glicosiltransferase, ambos envolvidos na resposta ao estresse ambiental e no fenômeno do dimorfismo. Nesse trabalho apresentam-se os primeiros transcritomas de *P. brasiliensis* fase específicos realizados por tecnologia de RNASeq, bem como transcritomas inéditos de um isolado defeutivo para o dimorfismo térmico, realizados na temperatura ambiente e a 37°C. Nesse contexto, a verticalização das análises tem o potencial de fornecer novas informações sobre o dimorfismo térmico e a morfogênese do fungo *Paracoccidioides* até o momento pouco explorados.

Palavras-chaves: *Paracoccidioides brasiliensis*, dimorfismo térmico, RNASeq.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis, systemic mycosis endemic in Latin America, is caused by the thermodynamorphic fungi of the *Paracoccidioides* complex. The disease is contracted by inhaling infectious conidia which, at body temperature (37°C), trigger the morphogenetic transition by developing yeast forms (L). From the isolate of *P. brasiliensis* Pb339 (ATCC32069), under a selective pressure of 400 µg/mL of the sulfamethoxazole, an isolate defective in thermal dimorphism (YRT, Yeast at Room Temperature) was selected. At room temperature (RT), even in the absence of the drug, the YRT isolate grows as a beige cerebriform mass. L cell aggregates, 1 to 3 buddings, ovoid, irregular and catenulate, suggestive of pseudohyphae, were recorded under optical and electronic microscopy (scanning and transmission). Unlike most isolates of *P. brasiliensis* that are readily removable from the surface of the culture medium at 37°C, it adheres strongly. The YRT isolate survived the infection challenge in mice, being recovered from the pulmonary lavage maintaining an atypical L phenotype at RT; induced significant increase and accumulation ($P < 0.05$) of neutrophils, but less accumulation of macrophages than the control. In YPD agar (0.1% or absence of D-glucose) and in minimal medium, a reversal was observed for the mycelial form (M) at RT and no growth at 37°C. The levels of chitin in the atypical isolate were lower ($p < 0.05$) than in the L controls, but higher than in the M forms. At 37°C and under drug pressure, it presented higher levels ($p < 0.05$) of reactive oxygen derivatives (ROS) than controls. RNA sequencing technology, RNASeq (Next-generation sequencing - Illumina), was applied for the first time to investigate the transcripts of the L and M stages of the Pb339 isolate and the atypical YRT isolate. We obtained 5×10^8 readings (PE 2x100, Q Phred ≥ 25), of which 3.2×10^8 were mapped to the reference genome Pb18. The estimated FPKM values of the biological replicates were positively correlated. The L and M phases of the Pb339 isolate have distinct transcripts, respectively, presenting 248 and 802 differentially expressed genes. The oxidative stress pathways were the most enriched. At 37°C the YRT and Pb339 isolates presented a similar transcriptional profile, involving 462 positively regulated genes. The transcriptase of the defective isolate YRT at RT was dramatically altered when compared to the M-phase of the reference isolate. We identified 387 differentially expressed genes in the YRT when compared to the M phase (Pb339). Oxidative and protein synthesis routes were the most representative; we observed over-representation of the genes with the cofactor binding function, ABC transporters and kinase signaling pathways. 125 genetic variants (SNP / Indel) were identified in the YRT isolate, 2 of which were associated with non-synonymous substitutions (MAPK3 and TAO3 / PAG1 genes involved in the regulation of mycelial growth of pathogenic fungi) and 4 with loss of function, highlighting the gene encoding the USP protein (universal stress protein) and a hypothetical gene containing repetitive regions of tetratricopeptides and glycosyltransferase domains, both involved in the response to environmental stress and in the phenomenon of dimorphism. In this work, we present the first transcriptomes of *P. brasiliensis* specific phases performed by RNASeq technology, as well as unpublished transcriptomes of a defective isolate for thermal dimorphism, performed at RT and at 37°C. In this context, the verticalization of the analyzes has the potential to provide new information on the thermal dimorphism and morphogenesis of the fungus *Paracoccidioides* so far little explored.

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*, thermal dimorphism, RNASeq.

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por cento
°C	Graus Célsius
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cDNA	DNA complementar
CIM	Concentração Inibitória Mínima
SMZ	Sulfametoxazol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucléico
gDNA	DNA genômico
h	hora
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
L	Leveduriforme
M	Micelial
m	minuto
Mb	Megabase
mg	miligrama
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
pb	pares de bases
Pb339_L	Amostra leveduriforme do isolado Pb339
Pb339_M	Amostra micelial do isolado Pb339

YRT_37_5D	Isolado YRT a 37°C com 5 dias de crescimento
YRT_TA_15D	Isolado YRT a TA com 5 dias de crescimento
YRT_TA_5D	Isolado YRT a TA com 5 dias de crescimento
RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotação por minuto
TA	Temperatura ambiente
UFC	Unidade Formadora de Colônia
YPD	<i>Yeast Peptone D-glucose</i> (meio contendo extrato de levedura, peptona e D-glucose)
YRT	Yeast at Room Temperature
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
µg	micrograma
µL	microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica atual do gênero <i>Paracoccidioides</i> e de <i>Laccasia loboi</i> , uma espécie de fungo, na América do Sul. Figura adaptada (Theodoro, 2012).....	23
Figura 2. Diagrama da morfologia celular dos principais fungos patogênicos que apresentam dimorfismo térmico.....	25
Figura 3. Fluxograma consolidado das ações do projeto e metodologias empregadas	43
Figura 4. Desenho esquemático do método de seleção de linhagens com alteração no dimorfismo térmico.....	45
Figura 5. Desenho esquemático do método de seleção do isolado com alteração no dimorfismo térmico na ausência da droga sulfametoxazol.....	56
Figura 6. Características macro e microscópicas do isolado <i>P. brasiliensis</i> Pb339.....	68
Figura 7. Documentação fotográfica da morfologia colonial de 13 amostras selecionadas a partir do isolado Pb339 de <i>P. brasiliensis</i>	71
Figura 8. Documentação fotográfica da morfologia colonial e por microscopia ótica do isolado Pb339 e do isolado atípico YRT.....	74
Figura 9. Documentação fotográfica das características macro e microscópicas do isolado Pb339 de <i>P. brasiliensis</i> e da sua isolado YRT com 7 dias de crescimento em caldo YPD. ...	76
Figura 10. Documentação fotográfica dos morfotipos coloniais e de seu aspecto micromorfológico obtidos após plaqueamento de sobrenadantes ricos em filamentos oriundos de cultivos YRT em caldo.....	77
Figura 11. Documentação fotográfica representativa de observações em microscopia ótica de estágios da transição de fases M e L associadas ao dimorfismo térmico do isolado Pb339 de <i>P. brasiliensis</i> e do isolado atípico YRT.	79
Figura 12. Curva de crescimento do isolado YRT e do isolado parental Pb339 a 37° C e à TA por contagem UFC.....	81

Figura 13. Figura Confirmação da identidade molecular do isolado YRT como pertencente a espécie <i>P. brasiliensis</i> por PCR convencional.....	82
Figura 14. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do isolado Pb339 de <i>P. brasiliensis</i> .	86
Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do isolado YRT de <i>P. brasiliensis</i> .	86
Figura 16. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das características ultraestruturas gerais do fungo <i>P. brasiliensis</i>	88
Figura 17. Níveis de quitina e ROS na isolado YRT em diferentes condições experimentais.	91
Figura 18. Avaliação da carga fúngica pulmonar e do infiltrado inflamatório.....	93
Figura 19. Fotodocumentação do isolado YRT cultivada em Ágar YP com 0.1% de D-glucose a 37° C.....	98
Figura 20. Fotodocumentação do isolado YRT cultivada em Ágar YP com 0.1% de D-glucose a TA.	98
Figura 21. Fotodocumentação da cultura YRT crescida Ágar YP na ausência de D-glucose.	99
Figura 22. Avaliação prévia da integridade das amostras de RNA total por eletroforese em gel de Ágarose em condições desnaturantes (NaClO).....	100
Figura 23. <i>Workflow</i> consolidado do <i>pipeline</i> de re-anotação genômica.	103
Figura 24. Comparações dos valores de FPKM dos transcritos entre as réplicas biológicas do isolado Pb339 e do isolado YRT, nas diferentes condições experimentais.....	107
Figura 25. Perfil transcricional do isolado Pb339 nas formas L e M de <i>P. brasiliensis</i>	110
Figura 26. Análise comparativa do perfil transcricional do isolado YRT e do isolado Pb339 em diferentes condições experimentais.	136
Figura 27. Análise do componente principal das amostras.....	172

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos antimicrobianos utilizados nos ensaios de CIM.....	46
Tabela 2. Detalhamento dos oligonucleotídeos utilizados no ensaio de PCR.....	50
Tabela 3. Condições de amplificação empregadas na técnica de PCR convencional	51
Tabela 4. Condições de amplificação empregadas na técnica de <i>Nested</i> PCR.....	51
Tabela 5. Condições experimentais para a extração de RNA total.....	59
Tabela 6. Resumo estatístico das montagens e dos genes das espécies do complexo <i>Paracoccidioides</i>	64
Tabela 7. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM50 e CIM90) de sulfametoxazol ($\mu\text{g/mL}$) para o isolado Pb339 (ATCC 32069) de <i>P. brasiliensis</i> em Ágar YPD.	70
Tabela 8. Resultados da análise comparativa com o algoritmo BLASTN para a confirmação da identidade molecular do isolado YRT.....	84
Tabela 9. Determinação da concentração inibitória mínima de drogas para a isolado YRT em caldo RPMI a TA e a 37° C.	95
Tabela 10. Avaliação do crescimento do isolado YRT em condição fisiológica humana de D-glucose (0.1%) e na ausência desse componente.....	97
Tabela 11. Estatística do sequenciamento RNASeq e da montagem do transcrito do isolado YRT e do isolado Pb339.	105
Tabela 12. Termos GO enriquecidos ou empobrecidos nos isolados Pb339 e YRT <i>P. brasiliensis</i> em diferentes condições experimentais.....	111
Tabela 13. Termos GO enriquecidos do transcrito das formas L do isolado Pb339 de <i>P. brasiliensis</i> , com 5 dias de crescimento a 37°C.....	112
Tabela 14. Termos GO enriquecidos do transcrito da forma M do isolado Pb339 de <i>P. brasiliensis</i>	118

Tabela 15. Termos GO enriquecidos do transcrito do isolado YRT de <i>P. brasiliensis</i> cultivado a 37° C com 5 dias de crescimento.	129
Tabela 16. Termos GO enriquecidos do transcrito do isolado YRT de <i>P. brasiliensis</i> cultivado a TA com 5 dias de crescimento.	131
Tabela 17. Termos GO enriquecidos do transcrito do isolado YRT de <i>P. brasiliensis</i> cultivado a TA com 15 dias de crescimento.	133
Tabela 18. Genes específicos do isolado YRT a TA com 15 dias de crescimento.	137
Tabela 19. Análise de variantes genéticas na isolado YRT de <i>P. brasiliensis</i>	142
Tabela 20. Escala de valores de qualidade <i>Phred</i> (Q)	162
Tabela 21. Avaliação precisa da integridade (RIN) e quantificação do RNA total pela plataforma <i>Bioanalyzer</i>	171

SUMÁRIO

Dedicatória.....	III
Agradecimentos.....	IV
Resumo.....	VI
Abstract.....	VII
Lista de abreviaturas	VIII
Lista de Figuras.....	X
Lista de tabelas.....	XII
1. Relevância e justificativa.....	17
2. Introdução	20
2.1 O gênero <i>Paracoccidioides</i> e a paracoccidioidomicose (PCM).....	21
2.2 O dimorfismo térmico e os aspectos morfofisiológicos de <i>P. brasiliensis</i>	24
2.3 Isolados de <i>Paracoccidioides</i> atípicos ou defectivos na transição dimórfica	28
2.4 Estudos “ômicos” das espécies de <i>Paracoccidioides</i> sp.	31
2.5 Biologia de Sistemas	36
2.6 RNASeq e análises computacionais	36
3 Objetivos.....	40
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos.....	41
4 Metodologia e desenvolvimento experimental.....	42
4.1 Desenvolvimento experimental	43
4.2 Manutenção do isolado Pb339 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	43
4.2.1 Seleção e manutenção do isolado Pb339 na presença da droga sulfametoxazol	44
4.3 Cinética de crescimento e viabilidade celular do isolado YRT.....	46
4.4 Caracterização morfológica por Microscopia.....	47
4.4.1 Microscopia ótica	47
4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET)	47
4.5 Identificação molecular do isolado YRT.....	48
4.5.1 Obtenção da massa celular.....	49
4.5.2 Lise celular, extração e quantificação do DNA	49
4.5.3 Reação em cadeia da polimerase	50
4.6 Ensaios de detecção de ROS (Espécies Reativas de Oxigênio) e de quantificação de quitina na parede celular	52
4.7 Ensaio de infecção animal para verificar a sobrevivência do isolado YRT em modelo experimental de PCM	52

4.8	Ensaio de estabilidade do fenótipo YRT, à TA e as 37°C, em diferentes condições nutricionais (meios de cultura) e físico-químicas	54
4.8.1	Ensaio de crescimento em Ágar YPD (1,5% D-glucose) na ausência de sulfametoxazol	54
4.8.2	Ensaio de crescimento em caldo YPD (1,5% D-glucose).....	56
4.8.3	Ensaio de crescimento na omissão de componentes do meio YPD	57
4.8.4	Ensaio de crescimento em meio mínimo ágar S (meio mínimo sintético) e SD (sintético adicionado de D-glucose).....	57
4.9	Análise do transcrito e dos genes diferencialmente expressos do isolado YRT.....	58
4.10	Extração do RNA total e controle de qualidade	58
4.11	Sequenciamento em larga escala (RNASeq) do transcrito do isolado Pb339 e de sua isolado atípico YRT de <i>P. brasiliensis</i>	59
4.12	Controle de qualidade do sequenciamento	60
4.13	Montagens do transcriptoma do isolado Pb339 e do isolado atípico YRT	60
4.13.1	Análises de reprodutibilidade dos dados	62
4.13.2	Análises da expressão diferencial entre os genes do isolado Pb339 e do isolado atípico YRT de <i>P. brasiliensis</i>	62
4.14	Integração de dados “omicos”	63
4.14.1	Anotação funcional e análises de enriquecimento de função.....	63
4.15	Investigação de alelos variantes	64
5	Resultados.....	65
I	- Caracterização geral do isolado atípico YRT de <i>P. brasiliensis</i>.....	67
5.1	Aspectos morfológicos do isolado Pb339 de <i>P. brasiliensis</i>	67
5.2	Seleção do isolado atípico YRT (<i>Yeast at Room Temperature</i>).....	69
5.3	Estabilidade fenotípica das culturas YRT na ausência de sulfametoxazol.....	72
5.3.1	Ensaio em Ágar YPD a TA e 37°C	72
5.3.2	Estabilidade do fenótipo atípico YRT em cultivos em caldo YPD à TA e a 37°C.....	75
5.3.3	Acompanhamento dos estágios de transição induzidas por temperatura dos isolados Pb339 e YRT	78
5.3.4	Cinética de crescimento do isolado YRT	80
5.4	Confirmação da identidade do isolado atípico YRT por sequenciamento e por amplificação de marcadores moleculares específicos	81
5.5	Aspectos ultraestruturais do isolado YRT e do isolado parental Pb339	85
5.5.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	85
5.5.2	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	87

5.6	Quantificação de quitina na parede celular e dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos isolados Pb339 e YRT	90
5.7	Sobrevivência e estabilidade do fenótipo do isolado YRT em animais de experimentação ..	91
5.7.1	Determinação da carga fúngica pulmonar do isolado atípico YRT e estabilidade do fenótipo.....	91
5.7.2	Avaliação da infiltrado inflamatório no pulmão dos animais após infecção com as diferentes amostras de <i>P. brasiliensis</i>	92
5.8	Resultados dos ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) de antimicrobianos frente à isolado YRT	94
5.8.1	Determinação da CIM em caldo RPMI.....	94
5.9	Influência das condições nutricionais na estabilidade do fenótipo atípico do isolado YRT: níveis de glicose e crescimento em meio mínimo	96
5.9.1	Ensaio com ágar YP (Extrato de levedura, Peptona).....	96
5.9.2	Ensaio com o meio mínimo sintético (S e SD).....	99
5.10	Avaliação qualitativa e quantitativa do RNA total extraído para análises de diferença de expressão.....	100
II - Análises computacionais.....		102
5.11	Re-anotação dos genomas de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb01, Pb03 e Pb18.....	102
5.12	Sequenciamento em larga escala do transcrito de <i>P. brasiliensis</i> , isolados Pb339 e YRT	104
5.13	Montagem por referência do transcrito do isolado Pb339 e do isolado YRT de <i>P. brasiliensis</i>	106
5.14	Análises do perfil transcricional dos isolados YRT e Pb339 em diferentes condições experimentais	108
5.14.1	Análise do perfil de expressão gênica das fases estágio-específicas L e M do isolado Pb339 de <i>P. brasiliensis</i>	108
5.14.2	Análise dos genes diferencialmente expressos na isolado YRT em diferentes condições experimentais	126
5.14.3	Análises dos genes preferencialmente expressos na isolado YRT.....	135
5.15	Análise de variantes genéticas no transcrito do isolado YRT	140
6	Discussão.....	143
A.	Apêndice.....	161
	Referências Bibliográficas.....	174

1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica humana, endêmica e prevalente na América Latina. O agente etiológico da PCM são os fungos termodimórficos do Complexo Paracoccidioides. Os fungos do Complexo Paracoccidioides são representados, até o momento, pelas espécies *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*, havendo relatos da existência de espécies crípticas caracterizadas molecularmente. O dimorfismo térmico, decisivo para a virulência desse patógeno, é uma característica que permite ao organismo alterar sua morfologia e fisiologia de acordo com as condições de temperatura, entre outras influências. À temperatura ambiente (TA) o organismo em questão adota a forma micelial (M); já em temperaturas em torno de 37°C (corpórea), converte-se a leveduriforme (L).

Observações prévias do nosso grupo quando da determinação da susceptibilidade de isolados do Complexo Paracoccidioides a antifúngicos visando selecionar subpopulações menos sensíveis (CRUZ, 2011), mostraram que o isolado Pb339 de *P. brasiliensis* quando cultivado em ágar YPD acrescido da droga sulfametoxazol (400µg/mL) e mantido à TA, apresentou colônias com bloqueio da morfogênese, permanecendo leveduriforme nessas condições. Naquela ocasião obtiveram-se três isolados atípicos, leveduriformes à temperatura ambiente que, contudo, foram perdidos em decorrência de falhas laboratoriais.

O estudo de isolados defectivos no dimorfismo é visto como de extrema importância uma vez que a dissociação da transição morfogenética na vigência das influências físico químicas que desencadeiam o processo não foi investigada até o momento (GOLDMAN e col., 2003). Nesse contexto, a motivação do presente trabalho centrou-se na possibilidade de se estudar o dimorfismo térmico de *Paracoccidioides brasiliensis*, sob a perspectiva de um isolado atípico, de morfogênese incompleta, ou seja, leveduriforme à TA, derivado do isolado PbB339 mantido em sulfametoxazol. Alcançou-se o desafio inicial de obter tal isolado (denominado YRT, Yeast at room temperature) sob as condições metodológicas de CRUZ (2011). Adicionalmente, selecionaram-se e mantiveram-se cultivos com fenótipo L estável na ausência da droga, independentemente das condições de temperatura.

De posse do isolado atípico YRT, a aplicação do conceito da Biologia de Sistemas para o entendimento de fenômenos biológicos complexos mostrou-se fundamental para a integração da informação biológica experimental e a bioinformática, tornando-se o cerne desse trabalho, extraindo e integrando conhecimento biológico útil. A investigação envolveu a caracterização morfofisiológica do isolado YRT e a identificação computacional de padrões

de expressão diferencial do isolado parental Pb339 fase específicos (M e L) e do isolado YRT atípico (TA e 37oC). As abordagens microbiológicas e bioquímicas e o sequenciamento profundo (deep sequencing) por RNASeq foram utilizados com o objetivo de identificar os genes diferencialmente expressos associados a morfogênese de *P. brasiliensis* e selecionar genes importantes na manutenção do fenótipo leveduriforme à TA. Investigou-se, ainda, variantes gênicas apresentando mutações potencialmente associadas ao bloqueio do dimorfismo desse isolado atípico.

A presente tese de doutoramento em Bioinformática apresenta a informação biológica e computacional incorporadas ao contexto da Biologia de Sistemas, proporcionando os meios para contribuir para entendimento de parte da complexa rede dos sistemas biológicos de *P. brasiliensis*. Vale ressaltar que esse trabalho teve a colaboração do grupo Genômica de Fungos do Broad Institute of MIT and Harvard, expoente na área temática e também do grupo Informática de Biosistemas e Genômica (BIG) do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) Fiocruz-Minas.

2. INTRODUÇÃO

2.1 O gênero *Paracoccidioides* e a paracoccidioidomicose (PCM)

O gênero *Paracoccidioides* (Eukaryota, Fungi, *Ascomycota*) é composto atualmente por duas espécies, *Paracoccidioides brasiliensis* e pela nova espécie *Paracoccidioides lutzii*, pertencentes à família dos fungos termodimórficos (*Ajjelomycetaceae*) (Lacaz, 1994; Teixeira *et al.*, 2009). Esses organismos são os agentes etiológicos da paracoccidioidomicose (PCM), doença grave que acomete seres humanos, uma micose sistêmica endêmica e prevalente na América Latina sendo, no Brasil, a oitava causa de morte por infecções crônicas e recorrentes e a mais importante causa de morte (51.2%) entre as micoses sistêmicas (Coutinho *et al.*, 2002; Prado *et al.*, 2009). Essa micose ocupa a décima posição entre as maiores endemias brasileiras e Coutinho e colaboradores (2002) registraram óbitos em 1/4 dos municípios brasileiros, sendo homens na faixa etária entre 30-60 anos de idade os indivíduos mais acometidos. As regiões Sul e Sudeste são as de maior prevalência e nas áreas endêmicas estima-se que a incidência da doença seja de 1 a 3 casos clínicos a cada 100.000 habitantes por ano. Apesar disso essas estatísticas não podem ser confirmadas pelo fato de a PCM não ser uma doença de notificação compulsória (Mcewen *et al.*, 1995; Aristizabal *et al.*, 1998; Coutinho *et al.*, 2002; Santo, 2008).

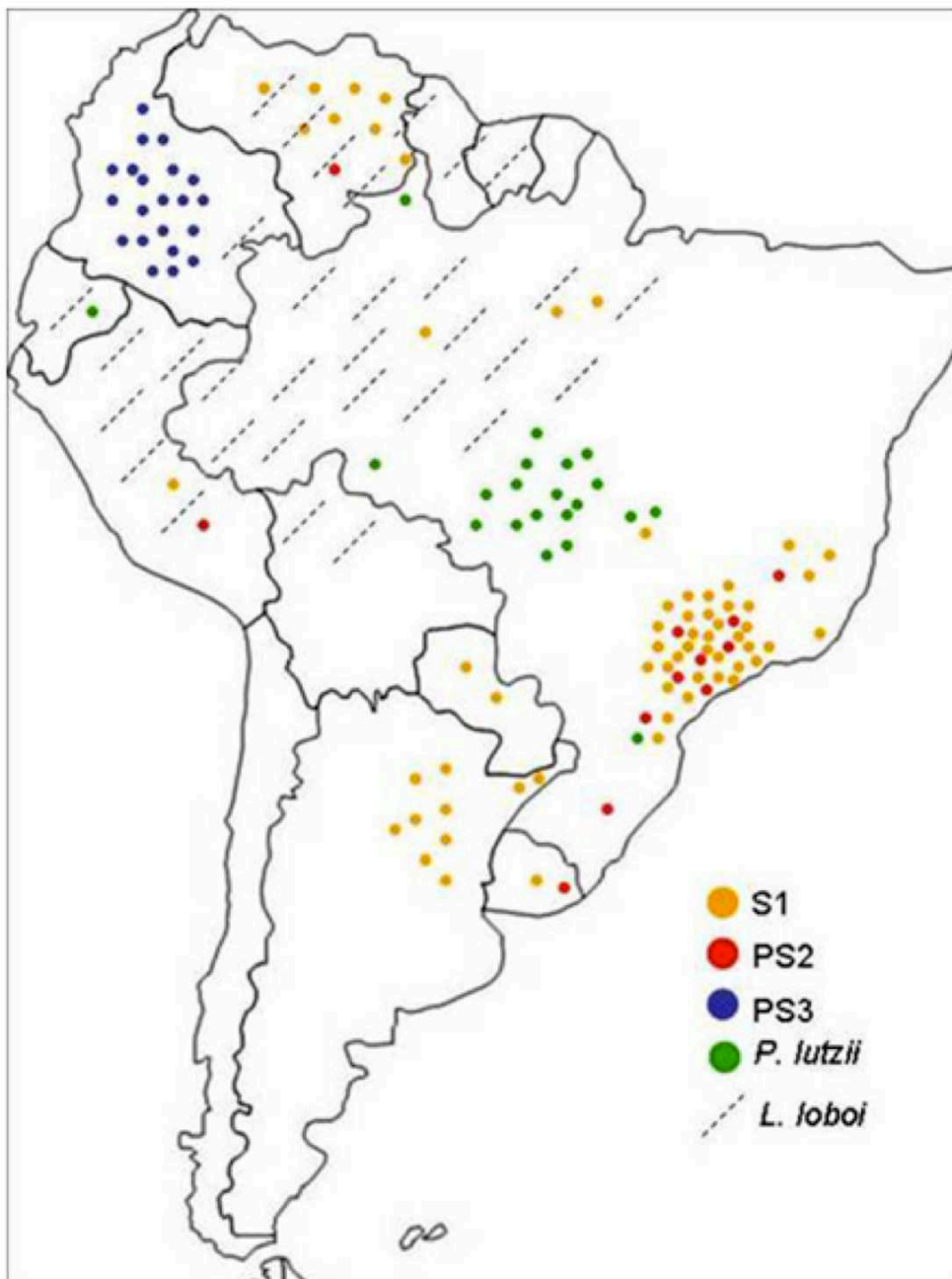
A PCM é naturalmente uma doença sistêmica e o agente etiológico é encontrado no hospedeiro sob a forma de levedura (L) (forma parasitária) e no ambiente, provavelmente, sob a forma de micélios (forma infectante), pois o habitat natural e outros aspectos da história natural e ecologia permanecem indeterminados (Mcewen *et al.*, 1995). O principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra o fungo é a resposta imune celular. No tecido acometido pode-se observar a formação de granulomas que limitam a disseminação das leveduras, presença de células epitelióides, halos de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares na vizinhança da lesão (Franco, 1987). A classificação das formas clínicas e avaliação da gravidade da doença é baseado nos critérios de topografia das lesões, gravidade da doença, resultados das reações sorológicas e história natural. Nesse contexto pode-se considerar duas formas clínicas progressivas sendo a primeira a forma aguda/subaguda, uma doença de progressão rápida disseminada pelo sistema linfático, predominantemente infantil e juvenil ocorrendo com incidência semelhante em ambos os sexos, e podendo afetar indivíduos de até 35 anos de idade. A segunda forma progressiva é a crônica, que acomete predominantemente homens adultos com idades entre os 30 e 60 anos. Ao contrário da forma aguda, a doença é de progressão lenta, silenciosa e as manifestações

pulmonares são frequentes na maioria dos casos (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Na forma crônica a micose tem maior incidência em indivíduos do sexo masculino e há vários estudos mostrando que o hormônio feminino β -estradiol teria uma ação protetiva em potencial. De fato, em ensaios experimentais observou-se como principal efeito associado ao hormônio feminino o bloqueio da conversão de micélio (conídio) para levedura (Loose *et al.*, 1983; Restrepo *et al.*, 1984; Salazar *et al.*, 1988; Aristizabal *et al.*, 1998; Shankar *et al.*, 2011).

A espécie *P. brasiliensis* abriga atualmente três espécies filogenéticas (S1, PS2, PS3) e a espécie *P. lutzii*, representada até recentemente pelos isolados denominados “Pb01-like” então uma das espécies crípticas no gênero. Os isolados de *P. lutzii* são quase todos originários da região Centro Oeste do Brasil e geneticamente similares ao isolado Pb01, uma isolado muito utilizada em estudos moleculares (Soares *et al.*, 1995; Calcagno *et al.*, 1998; Cano *et al.*, 1998; Niño-Vega, Calcagno, *et al.*, 2000; Feitosa *et al.*, 2003; Matute *et al.*, 2006; Puccia *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2009; Theodoro *et al.*, 2012). O mapeamento da distribuição biogeográfica das espécies crípticas de *Paracoccidioides* na América do Sul é mostrado na Figura 1. Pode-se notar a existência de um forte agrupamento que relaciona a origem e a distribuição das espécies. *P. lutzii* prevalece na região centro-oeste, mas já se observaram isolados no Paraná, no Pará, Rondônia e no Espírito Santo (Takayama *et al.*, 2010; Marques-Da-Silva *et al.*, 2012; Theodoro *et al.*, 2012; Teixeira *et al.*, 2014; Alves *et al.*, 2015). Inferir a origem e histórico biogeográfico desses organismos é tarefa desafiadora que necessita de estudos meticulosos que devem considerar variáveis como a constante migração entre os hospedeiros humanos e um longo período de latência da PCM, o que faz com que a origem dos isolados clínicos não reflita com precisão a distribuição geográfica do patógeno, ressaltada a escassez de isolados ambientais (Theodoro *et al.*, 2012). Recentemente, Arantes e colaboradores (Arantes *et al.*, 2016) relataram dados interessantes relativos à eco-epidemiologia das espécies de *Paracoccidioides* e sua distribuição com base na detecção molecular e avaliação da diversidade genética das duas espécies em amostras de solo e em aerossóis das tocas de tatus nas regiões norte (Rondônia), central (Goiás) e sudeste (Minas Gerais) do Brasil. Ambas as espécies foram detectadas a partir de amostras de solo (67,5%) e aerossóis (81%) em todas as regiões geográficas, por meio da amplificação da região do espaçador interno transcrito (ITR) em PCR e por hibridização *in situ*. A ocorrência das duas espécies em solos e em aerossóis das tocas de tatus, em todas as regiões geográficas pesquisadas, difere da prevalência das espécies revelada a partir da identificação específica de isolados clínicos. Foram também detectadas variantes genéticas não relatadas até o

momento entre isolados clínicos ou de tatus. Essa abordagem tem potencial para refletir a ocorrência real das espécies de *Paracoccidioides* em seu ambiente saprofítico.

Figura 1. Distribuição geográfica atual do gênero *Paracoccidioides* e de *Laccasia lobo*, uma espécie de fungo, na América do Sul. Figura adaptada (Theodoro, 2012).



2.2 O dimorfismo térmico e os aspectos morfofisiológicos de *P. brasiliensis*

Dimorfismo é um termo que se refere à habilidade de certos fungos de alterar reversivelmente a sua morfologia entre dois aspectos, hifas ou leveduras. Entre os fungos patogênicos há aqueles capazes de realizar o dimorfismo tendo como principal estímulo a alteração da temperatura, sendo conhecidos como fungos termodimórficos, e há aqueles que não dependem de temperatura e sim de outros fatores, como níveis de O₂, CO₂, nutrientes e outros. Apesar de a temperatura ser o principal estímulo para os fungos termodimórficos, outros fatores como nível de CO₂, de cisteína, de estradiol influenciam a conversão (Gauthier, 2015)

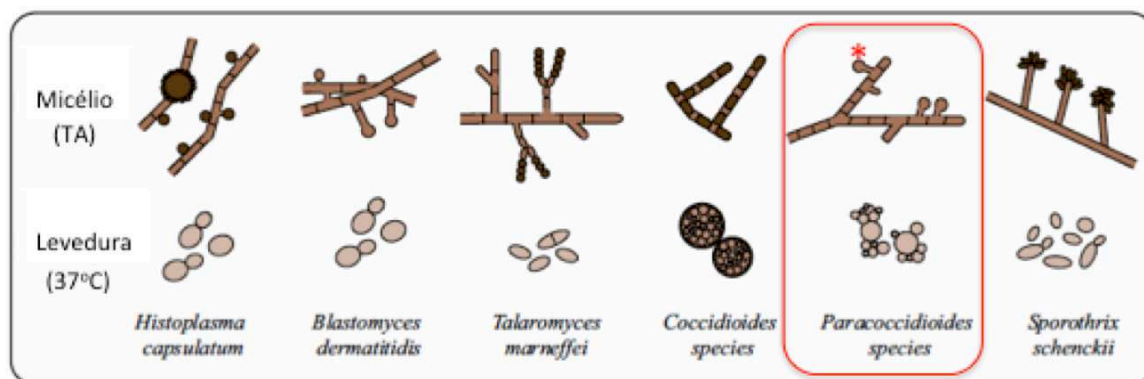
O dimorfismo térmico é uma adaptação morfogenética especializada importante para a patogenicidade de alguns fungos e crítica pelo fato de a conversão ser decisiva para a infectividade e capacidade do fungo em resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro, causando a doença. Esta transição de fases dependente de temperatura possibilita que os propágulos (ou conídios) gerados na fase M e dispersados por via aérea sejam inalados pelo homem e animais, atingindo os alvéolos pulmonares, onde se convertem para a forma L, sendo estes os elementos parasitários teciduais. Nos pulmões os conídios são reconhecidos por células do sistema imune inato, via receptores de lectinas e manose, sendo fagocitadas germinam e replicam intracelularmente como leveduras. No hospedeiro humano, os fatores externos que as células fúngicas devem enfrentar incluem pH e temperatura, limitação de nutrientes, estresses osmótico e oxidativo, entre outros (Brummer *et al.*, 1993; Lacaz, 1994).

Os fungos termodimórficos são considerados patógenos primários, pertencendo ao filo Ascomycota, incluindo espécies do gênero *Paracoccidioides* (*P. brasiliensis* e *P. lutzii*), *Talaromyces marneffeii* (recentemente renomeado de *Penicillium marneffeii*), *Blastomyces dermatitidis* (teleomórfico *Ajellomyces dermatitidis*), espécies do gênero *Coccidioides* (*C. immitis* e *C. posadasii*), *Histoplasma capsulatum* (teleomórfico *Ajellomyces capsulatum*) e espécies do gênero *Sporothrix*, como *S. schenckii* (teleomórfico *Ophiostoma schenckii*) e *S. brasiliensis*. Nesse grupo de fungos, a morfogênese associa-se ou mesmo promove a patogênese da doença (Boyce e Andrianopoulos, 2015). A Figura 2 apresenta os aspectos morfológicos dos fungos dimórficos patógenos humanos que, em geral, crescem como hifas multicelulares à temperatura ambiente (TA) (25-28° C), sendo capazes de se converter para a

forma unicelular ou leveduriforme a 37°C, exceto pelas espécies de *Coccidioides* que produzem esférulas, as quais englobam numerosas células individuais conhecidas como endosporos, durante a infecção (Nemecek *et al.*, 2006; Boyce e Andrianopoulos, 2015).

Figura 2. Diagrama da morfologia celular dos principais fungos patogênicos que apresentam dimorfismo térmico.

Aspectos morfológicos de crescimento dos ascomicetos dimórficos e patógenos humanos *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Talaromyces marneffi* (*Penicillium marneffi*), *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Sporothrix Schenckii*. Em geral esses fungos crescem a temperatura ambiente (TA) sob a forma de hifa multicelular e a mudança de temperatura para 37°C estimula a conversão para a forma de levedura, com exceção das espécies do gênero *Coccidioides* (formação de esférulas). O retângulo vermelho destaca a morfologia da espécie de *Paracoccidioides*; asterisco vermelho destaca a estrutura de conídios. Figura adaptada (Boyce, 2015).



Isolados das espécies de *Paracoccidioides* cultivados *in vitro*, à TA, apresentam-se como pequenas colônias brancas, cotonosas, que se aderem fortemente ao Ágar, apresentando hifas septadas multicelulares (micélios) com clamidósporos terminais ou intercalares, capazes de se reproduzir por meio de esporos exógenos (conídios). A 37°C, o fungo apresenta a morfologia L, unicelulares, mostrando um, dois ou múltiplos brotamentos; colônias de cor creme, aspecto cerebriforme, formadas por células esféricas, ovóides ou em forma de correntes (catenuladas) de tamanho variável (4,0 – 30,0 µm) (Angulo e Pollak, 1971; Paris *et al.*, 1985). A possibilidade de cultivo e manejo desses organismos em laboratório torna possível reproduzir, *in vitro*, o processo de transição, submetendo o fungo a mudanças de temperatura de incubação (San-Blas *et al.*, 2002).

A transição dimórfica em *Paracoccidioides* é um aspecto complexo e multifatorial que, ainda hoje, permanece pouco compreendido. Formas transitórias podem ser observadas durante a conversão M → L e L → M nas primeiras 4 horas de conversão. Na transição M → L

observam-se células L com dilatações intercalares ou terminais iniciando a formação dos segmentos de hifas, células catenuladas (forma de correntes) ou únicas, isoladas ou agrupadas, em diferentes tamanhos. Na transição L→M os brotos se alongam e apresentam diâmetros maiores que os das leveduras típicas, ramificações não são observadas nos brotos, mas aparecem após 24h com a presença das hifas verdadeiras (Carbonell e Rodriguez, 1965; Hallak *et al.*, 1982). Estudos bioquímicos e de microscopia sobre o dimorfismo tem demonstrado que a conversão ocorre em associação com mudanças estruturais e de componentes químicos da parede celular, particularmente na substituição das β -1,3-glucanas, presente na forma M e das α -1,3-glucanas mais abundantes na forma L, reorganização de lipídios de membrana, principalmente glicolipídios. Na maioria dos fungos a quitina, um polissacarídeo polimérico de resíduos de N-acetilglucosamina em ligações β -1,4, é o maior componente estrutural da parede celular. Em *P. brasiliensis* a quitina representa em torno de 43% do peso seco da parede celular das leveduras, enquanto nas hifas compõe apenas 13% da estrutura (Niño-Vega, Munro, *et al.*, 2000; Puccia *et al.*, 2011). Tais alterações estruturais observadas durante a morfogênese são vistas como capazes de contribuir para incrementar o potencial de virulência desse organismo e para a sua resistência ao sistema imune do hospedeiro (San-Blas e Nino-Vega, 2001; Nunes *et al.*, 2005).

A associação entre transição dimórfica e patogenicidade tem sido demonstrada desde trabalhos seminais, de há quase trinta anos atrás. Em *H. capsulatum* o composto PCMS (ácido p-cloromercurifenilsulfônico), um inibidor de grupos sulfidril, foi capaz de prevenir a morfogênese, bloqueando especificamente a conversão M→L, de forma irreversível, sem interferir no crescimento ou na conversão L→M. Linhagens de *H. capsulatum* tratadas com PCMS foram avirulentas em modelos de infecção experimental em camundongos, não sendo recuperadas colônias a partir de tecidos de animais infectados com a isolado tratada. Um ponto importante levantado pelos autores foi o papel da cisteína e dos compostos contendo sulfidril na manutenção da respiração e dos níveis de ATP durante a transição (Medoff *et al.*, 1986). De fato, demonstrada a associação entre transição dimórfica e patogenicidade, linhagens de fungos dimórficos incapazes de se converter em leveduras são, nessa condição, avirulentas.

Os primeiros fatores de virulência a serem conhecidos nos fungos dimórficos, como Cbp1 (*calcium binding protein 1*) e Yps3 (*yeast-phase specific gene 3*) de *H. capsulatum*, foram caracterizados entre aqueles fatores mais abundantes e que eram secretados apenas

pelas leveduras. Sucessivamente, vários genes codificadores de fatores de virulência e específicos da fase leveduriforme foram identificados e caracterizados, um a um, e quando estudados por genética reversa (para alguns destes fungos há, desde o final da década de 90, sistemas robustos de silenciamento gênico) revelaram-se mecanismos pelos quais a transição de fases promove a patogênese da doença. As abordagens genéticas baseadas na ruptura ou silenciamento gênico tem com um dos objetivos definir a função de genes alvo e de caracterizar decisivamente potenciais fatores de virulência cujo silenciamento resulta em atenuação de virulência das linhagens (Klein e Tebbets, 2007; Sil e Andrianopoulos, 2014).

É interessante destacar aqui que, exatamente como consequência da disponibilidade dessas ferramentas genéticas, Nemecek e colaboradores (2006) apresentaram uma evidência considerada cabal da importância decisiva da transição dimórfica M→L para a patogênese das micoses sistêmicas causadas pelos fungos dimórficos: - o uso de mutagênese insercional por *Agrobacterium tumefaciens* revelou em *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* a existência de um regulador global do dimorfismo e, conseqüentemente, da patogenicidade: - uma histidina quinase, codificada pelo gene *DRK1* (*dimorphism regulating kinase*). A ruptura e/ou o silenciamento do gene *DRK1* “congela” *B. dermatitidis* como uma forma intermediária entre micélio, não leveduriforme, à temperatura de 37°C. Portanto, requerida para a transição de micélio para levedura, a histidina quinase codificada pelo gene *DRK1* é parte de um sistema de dois componentes que realiza o sensoriamento, sinaliza e responde às condições do meio ambiente externo, como o estresse térmico, induzindo a conversão de fases e a expressão de fatores de virulência característicos da fase parasitária, leveduriforme, dos patógenos dimórficos.

Sucessivamente, outros trabalhos empregando abordagens semelhantes em *Histoplasma* revelaram novas e importantes moléculas regulatórias chave requeridas para a transição de fases dependente de temperatura, como os genes *RYP* (*required for yeast phase*) *I-4* Nguyen (Nguyen e Sil, 2008; Webster e Sil, 2008; Beyhan *et al.*, 2013). Mutantes *ryp1* são constitutivamente filamentosos, independentemente da temperatura, e *Ryp1* apresenta significativa homologia N-terminal com *Wor1*, um importante regulador transcricional chave no processo de transição *white-opaque* necessária para o acasalamento em *Candida albicans* (Nguyen e Sil, 2008). Mutantes *ryp2* e *ryp3* também crescem constitutivamente como filamentosos, independentemente da temperatura. *Ryp2* e *Ryp 3* foram descritos como dois reguladores da morfologia de *Histoplasma*, responsivos à temperatura; são homólogos entre

si e a outros membros da família Velvet A de proteínas regulatórias encontradas em espécies de *Aspergillus* e de outros fungos filamentosos (Webster e Sil, 2008). Beyhan e colaboradores (2013) revelam a rede transcricional responsiva a temperatura em *Histoplasma*, promotora do *switch* da forma filamentososa à TA para a leveduriforme a 37°C. Os autores apresentaram evidências de que Ryp1 (família WOPR de proteínas) interagem com os elementos Ryp2 e Ryp3 (família Velvet) e os elementos Velvet se associam ao DNA para dirigir a expressão gênica. Eles dissecaram o circuito regulatório e identificaram um quarto fator (Ryp4) que é requerido para o crescimento e expressão gênica na fase de levedura, o qual se associa ao DNA e realiza a regulação do processo em interdependência com os demais.

2.3 Isolados de *Paracoccidioides* atípicos ou defectivos na transição dimórfica

Os trabalhos mencionados anteriormente empregaram ferramentas de genética molecular reversa para gerar linhagens mutantes cuja morfogênese era defectiva ou alterada. Há na literatura alguns relatos e descrições de isolados que apresentaram uma transição defectiva alguns sendo isolados clínicos e outros linhagens que apresentaram alterações induzidas por mutagênese química. Há relatos de ocorrência de linhagens leveduriformes incapazes de se converter para a forma micelial quando incubadas a TA, contudo, a partir do subcultivo sucessivo em laboratório, muitas dessas amostras se mostraram inviáveis (Villar *et al.*, 1988; Villar e Restrepo, 1989; Hamdan e Ferrari, 1995; Hahn *et al.*, 2002).

Hallak e colaboradores (1982) demonstraram que nitrosoguanidina induziu mutações no isolado IVIC Pb73 que afetaram a habilidade do fungo em completar o dimorfismo. Algumas amostras não se transformaram na forma típica M a 23°C, se mantendo numa forma aparentemente transitória similar a pseudo-hifas, enquanto outras não cresciam a 37°C. Observaram-se mutantes com colônias atípicas de aspecto cerebriforme apresentando células catenuladas e agrupadas, aspectos macro e microscópico estes observados tanto a 23°C quanto a 37°C. A estabilidade e a manutenção do fenótipo mutante, contudo, mostrou-se difícil e a reversão para o fenótipo selvagem foi altamente frequente nesse ensaio (Hallak *et al.*, 1982). Villar *et al.* (1988) observaram o desenvolvimento tanto de colônias miceliais quanto de cerebriformes a partir da germinação de conídios em meio BHI e em meio quimicamente definido, suplementados ou não com soro fetal bovino. O percentual de

colônias cerebriformes, denominadas YRT (*yeast at room temperature*) foi de 18,5%. Na presença de soro fetal a morfologia leveduriforme se mantinha para 95% das colônias selecionadas, cujos aspectos micromorfológicos foram considerados similares aos das leveduras usuais. Villar e Restrepo (1989) compararam a virulência de uma amostra que dava origem a variantes leveduriformes à TA (YRT). Os dados indicaram maior virulência para a isolado que se mostrou leveduriforme à TA. San-Blas e colaboradores (1992) selecionaram novamente mutantes para morfologia colonial a partir do tratamento do isolado IVIC Pb09 com nitrosoguanidina. Dos mutantes selecionados, a isolado Pb267 apresentou formas semelhantes a leveduras a 23°C, apresentando tanto células L típicas quanto outras que se assemelhavam a pseudo-hifas. Esse mutante mostrou baixa taxa de reversão para a forma M a 23°C mas, foi incapaz de sobreviver a 37°C; contudo, a estabilização e manutenção dos mutantes sem reversão ao fenótipo selvagem mostrou-se novamente um desafio (San-Blas e San-Blas, 1992). Hamdan e Ferrari (1995) relataram o isolamento, a partir de um paciente com paracoccidiodomicose disseminada crônica, de uma isolado atípico (denominada JT-2) que produziu colônias cerebriformes (e células leveduriformes) à TA, e que não se desenvolvia bem a 37°C; foi mantida por mais de 4 anos em laboratório, com subcultivos mensais. Hahn e colaboradores (2002) buscaram caracterizar e diferenciar molecularmente, por RAPD, dois isolados atípicos (leveduriformes à TA, JT-2 e 1430) comparando-os a 4 outros isolados que se comportavam normalmente na transição dimórfica induzida por temperatura. A técnica foi útil para distinguir cada um dos isolados entre si mas não para distinguir os atípicos dos demais. Amostras atípicas de *P. brasiliensis*, incapazes de completar a transição dimórfica a 37°C após manutenção prolongada em óleo mineral, mas que se mostraram cerebriformes, apresentando aspectos intermediários quando cultivadas à TA, foram caracterizadas morfológica, bioquímica e molecularmente por Borba e colaboradores (2005). Cabe ainda mencionar aqui o trabalho de Borges e colaboradores (2011) que realizaram uma análise de diferença representacional (RDA) entre a amostra Pb01 (*P. lutzii*) e um isolado clínico que permanecia micelial na temperatura do hospedeiro, ou seja, não se convertia para a forma de levedura, continuando filamentosa a 37°C, o isolado Pb4940. Essa análise consistiu em amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de duas bibliotecas de cDNA, seguida de hibridação subtrativa e confirmação por PCR em tempo real (Real time PCR). Os transcritos que exibiram expressão aumentada na fase leveduriforme parasitária foram aqueles envolvidos na resposta ao estresse oxidativo e térmico como proteínas de choque térmico, entre as quais HSP30, α -trealose-fosfatossintetase, a proteína DDR48, além de proteínas relacionadas à parede celular e membrana,

sugerindo, nesse caso, a importância da superfície celular no remodelamento decorrente do dimorfismo (Borges *et al.*, 2011). Cruz (2011) realizou a seleção de sub-populações de *P. brasiliensis* em concentrações crescentes de sulfonamida, superiores à concentração inibitória mínima (CIM) (para a sulfonamida a amostra parental Pb339 apresentou CIM = 300 µg/ml) visando o isolamento e caracterização de subpopulações menos susceptíveis (ou resistentes a antimicrobianos). Um achado paralelo interessante foi a observação e isolamento de subpopulações derivadas do isolado Pb339 que apresentaram morfologia cerebriforme, estável à temperatura ambiente, selecionadas em 400 µg/mL de sulfametoxazol (SMZ) (Sigma®), o que foi sugestivo de alterações no padrão de transição dimórfica. As subpopulações (3 amostras) foram denominadas BCL (BCL1, BCL2 e BCL4) (Cruz, 2011). Contudo, as amostras BCL que chegaram a ser mantidas em laboratório por período superior a dois anos, perderam-se quando do descongelamento acidental do freezer em que eram armazenadas.

A influência de drogas, além dos meios de cultivos, tempo e temperatura de incubação são aspectos que também podem influenciar o dimorfismo desse agente. Nakai e colaboradores (2003) avaliaram a atividade antimicrobiana e determinaram a concentração inibitória mínima (CIM), comparando a ação do antifúngico micafungina (FK463) com a anfotericina B, itraconazol e fluconazol em isolados de *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *B. dermatitidis*, e *S. shenckii*, nas fases L e M. Nesse trabalho, os autores relataram que algumas culturas L incubadas a 35°C na presença das drogas, cresceram como uma forma incompleta ou atípica de levedura e observaram-se hifas crescendo a partir dessas células (Nakai *et al.*, 2003). Cruz e colaboradores (2012) encontram resultados semelhantes ao utilizar o caldo RPMI 1640 em testes de susceptibilidade para a determinação de CIM para os antifúngicos anfotericina B, itraconazol, cetoconazol, fluconazol, sulfametoxazol, sulfametoxazol-trimetoprim e terbinafina, em 21 isolados clínicos de *Paracoccidioides*, incubados a 37°C. Nestas condições, o isolado Pinguim, apresentou forma transitória L→M a partir do segundo dia de crescimento. Tais resultados sugerem que outros fatores, nutricionais (níveis de cisteína e outros compostos contendo sulfidril) ou físico-químicos (concentrações de CO₂, pH, condições iônicas) também estão implicados no processo de dimorfismo e seriam potenciais interferentes na morfologia do fungo contribuindo para ocorrer a conversão de L→M mesmo a 37°C (Cruz *et al.*, 2012).

2.4 Estudos “omicos” das espécies de *Paracoccidioides* sp.

Desenvolveram-se nos últimos 12-15 anos abordagens genômicas e proteômicas que foram usadas para perfilar a transcrição gênica e a expressão de proteínas nas fases micelial e leveduriforme de fungos dimórficos. Análises comparativas de transcriptomas confirmaram a existência de alterações importantes na expressão gênica durante a transição dimórfica, identificando centenas de genes diferencialmente expressos nas fases M e L (Klein e Tebbets, 2007). Diferentes autores, a partir de 2003, empregaram ensaios e abordagens distintas para analisar o perfil transcricional das duas espécies do gênero *Paracoccidioides* expostas a variadas condições ambientais (estresse térmico, estresse oxidativo, exposição a drogas e processos antimicrobianos, depleção nutricional de fontes de carbono).

Entre os primeiros trabalhos encontra-se o relato de Felipe e colaboradores (Felipe *et al.*, 2003) que analisaram perfil transcricional do isolado Pb01 (então denominado *P. brasiliensis* mas, posteriormente, reconhecido como a nova espécie, *P. lutzii*) identificando aqueles específicos de micélio e de leveduras. Um total de 3.938 ESTs (Y = 1.654 e M = 2.274) foram sequenciados e agrupados em 597 contigs e 1.563 singlets, totalizando 2.160 genes, que representaram cerca de 1/4 do repertório gênico previsto. Destes, 1.040 foram anotados e 894 puderam ser classificados em 8 categorias funcionais (COG): metabolismo celular (44%); estocagem e processamento de informações (25%); processos celulares — divisão celular, modificações pos-traducionais, entre outros (19%); e genes com função desconhecida (12%). Análise computacional permitiu a identificação de vários genes fase-específicos. Foram encontrados 14 grupos considerados específicos de leveduras e 27 grupos micélio-específicos. Vários dos genes fase-específicos estão potencialmente envolvidos na transição dimórfica, patogenicidade e em resistência a drogas.

Felipe e colaboradores (2005) (Felipe, Andrade, *et al.*, 2005; Felipe, Torres, *et al.*, 2005) detalharam o perfil metabólico de *Paracoccidioides* (isolado Pb01, *P. lutzii*). Foram reconhecidas 6.022 ESTs (correspondentes a cerca de 80% dos genes previstos no genoma) e utilizadas sondas de cDNAs para comprovar padrões de hibridação específicos de cada fase. Das 6.022 ESTs (PbAESTs), 4.198 (69.4%) mostraram um provável homólogo nos bancos de dados GenBank e 4.130 (68.3%) eram homólogos a genes descritos em fungos. O total de 2.931 PbAESTs puderam ser classificadas em 12 categorias principais. Os dados forneceram uma visão abrangente do metabolismo incluindo transcritos super-expressos, genes estágio específicos e regulados positiva e negativamente. Estes autores identificaram 328 genes

diferencialmente expressos durante a transição de fases, 58 em micélio e 270 em leveduras. Os genes positivamente regulados se enquadram em múltiplas categorias relacionados ao ciclo celular, resposta ao estresse, resistência a drogas, vias de transdução de sinais, entre outros. Foram observados genes correspondentes a enzimas do ciclo do citrato, refletindo a habilidade do fungo para realizar a degradação aeróbica completa do piruvato e fosforilação oxidativa. Sua provável capacidade de crescer em anaerobiose foi evidenciada pela indicação de conversão alternativa do piruvato a etanol, além de provavelmente ser capaz de utilizar compostos de dois carbonos na forma de acetato e etanol por meio do ciclo do glioxilato e obter sulfito e nitrito do ambiente. Sugere-se, com base nos achados, que o metabolismo do micélio seria predominantemente aeróbio enquanto a levedura realizaria metabolismo anaeróbico fermentativo (expressão aumentada de álcool desidrogenase I e piruvato desidrogenase E1), tendo apresentado também maior expressão de genes que indicam a realização do ciclo do glioxilato (isocitrato liase, entre outros). O fungo tem o aparato enzimático para a biossíntese de vários carboidratos, incluindo glicogênio, amido, maltose, glucanas, quitosana, quitobiose, quitina, glicosaminoglicanos, lipopolissacarídeos, peptidoglicanos, mucopolissacarídeos e lipoglicoproteínas, mas não pectina. Produz âncoras de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). Vários mono e dissacarídeos podem ser assimilados como D-glucose, D-frutose, D-galactose, D-manose, D-manitol, D-inositol, D-sorbitol, α -trealose, sacarose, mas não L-sorbose, L-fucose e L-lactose. É capaz de sintetizar todos os aminoácidos, exceto asparagina; arginina pode ser degradada até ornitina e uréia, a qual pode ser degradada a amônia e CO₂. Assinalou-se a anotação dos principais genes envolvidos no ciclo celular e na maquinaria básica do fluxo de informação genética; sequências relacionadas a replicação mitocondrial, brotamento, esporulação e acasalamento; identificaram-se diversos fatores de transcrição, e nove grupos de chaperonas, várias sendo diferencialmente expressas (HSP60, HSP70, HSP90); genes codificadores de várias enzimas com atividades antioxidantes como superóxido-dismutases, catalases, peroxidases, glutationa-S-transferases; genes representativos de vias de sinalização celular, como MAPK, cAMP/PKA, cálcio-calmodulina-calcinerina; além de uma oxidase alternativa e genes envolvidos em resistência a multidrogas, como *Major Facilitator Superfamily* (MSF), *Pleiotropical Drug Resistance* (PDR) e outros transportadores ABC (Felipe, Andrade, *et al.*, 2005; Felipe, Torres, *et al.*, 2005).

Goldman e colaboradores (Goldman *et al.*, 2003) , adotaram uma abordagem semelhante para a análise do perfil transcricional de *P. brasiliensis* (isolado Pb18), um

levantamento de 13.490 ESTs da fase L, apresentando a sequência de 4.692 genes (~50% dos genes previstos no genoma). Os autores identificaram homólogos de vários fatores de virulência e patogenicidade descritos em *C. albicans*, selecionando-se alguns para estudar sua expressão diferencial durante a transição micélio-levedura, por meio de PCR quantitativo em tempo real. Marques e colaboradores (2004), utilizaram a técnica da supressão-subtração-hibridação (SSH) e análises por *macroarray* com o objetivo de identificar genes diferencialmente expressos na fase de levedura de *P. brasiliensis* (isolado Pb18), validando alguns dos achados por qRT-PCR. Identificaram-se genes relacionados ao metabolismo básico, transdução de sinais, crescimento e morfogênese, e metabolismo de enxofre. Os autores foram capazes de identificar 38 agrupamentos cujos níveis de expressão foram de 1,5-6,6 vezes maiores em leveduras, 28 dos quais apresentaram algum grau de homologia com genes previamente listados em bancos de dados. Os autores comentam que, dado o desacoplamento da fosforilação oxidativa na transição M-L em *P. brasiliensis* ser marcada por alterações na respiração e rápido declínio de ATP intracelular (Medoff *et al.*, 1986; Maresca e Kobayashi, 1989), o crescimento a 37°C deve dar origem a uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (ROS) dado o aumento da temperatura, o que sugere que os sistemas antioxidantes encontrados em *P. brasiliensis* podem ser extremamente importantes não só para a sobrevivência no interior de macrófagos mas também para a desintoxicação de ROS, o que pode explicar os elevados níveis de enzimas como tioredoxina peroxidase e glutathione-S –transferases (Goldman *et al.*, 2003).

Nunes e colaboradores (Nunes *et al.*, 2005) empregaram um *biochip* com sequências de 4692 genes de *P. brasiliensis* (isolado Pb18) para monitorar a expressão em diferente pontos da transição micélio - levedura (de 5 a 120h). Observaram-se 2.583 genes com modulação estatisticamente significativa em pelo menos um ponto da medição. Houve alterações em enzimas do catabolismo de aminoácidos, na transdução de sinais, síntese protéica, metabolismo da parede celular, estrutura do genoma, resposta ao estresse oxidativo, controle de crescimento e desenvolvimento. Estudou-se o padrão de expressão de 20 genes por qRT-PCR o que revelou estreita coerência entre os métodos empregados. Tendo verificado que o gene *4-HPPD* (*4-hydroxyl-phenyl pyruvatedioxygenase*) era altamente expresso durante a morfogênese foram realizados ensaios utilizando NTBC [2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione], um inibidor específico do produto do gene *4-HPPD*, o qual, quando acrescido ao meio de cultura, foi capaz de bloquear a transição M → L (Nunes *et al.*, 2005).

Discutindo aspectos determinantes da morfogênese, Goldman e colaboradores (2003) mencionaram o fato de, em *S. schenckii*, poder ocorrer dissociação entre alterações de temperatura e a resposta morfogenética, sendo possível obter-se a fase leveduriforme independentemente de alterações de temperatura, ocorrendo em função de alterações nos meios de cultura e condições de cultivo, tais como agitação em frascos fechados, à temperatura ambiente. As leveduras assim obtidas em *S. schenckii* foram morfológicamente idênticas às obtidas em cultivos a 37°C. Os autores sugeriram que seria interessante seguir a expressão de genes específicos em cultivos leveduriformes que não houvessem sido submetidos a alterações de temperatura (Goldman *et al.*, 2003). Marques e colaboradores (2004) comentaram a ausência de tentativas de se induzir a morfogênese de micélio para levedura em *P. brasiliensis* pois alguns dos genes preferencialmente expressos talvez não fossem necessariamente relacionados à diferenciação morfológica mas, sim, necessários para a adaptação fisiológica a um novo ambiente. Estes autores contemplaram a possibilidade de que a auxotrofia para enxofre orgânico descrita na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* (Paris *et al.*, 1985) possa ser um importante estímulo de permanência do fungo como levedura, ao lado da temperatura. Coerentemente, estes autores verificaram que vários genes envolvidos na assimilação de metionina, como a metionina permease, são altamente expressos na fase L, indicando um possível papel do metabolismo de enxofre na manutenção da forma de levedura (Goldman *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2004), como já se descreveu em *H. capsulatum*.

Sucessivamente, diferentes autores estudaram a resposta adaptativa desses microrganismos principalmente na busca de melhor compreender aspectos da sua interação com o hospedeiro e após exposição a drogas já utilizadas ou promissoras no tratamento da micose, revelando a plasticidade da expressão gênica em diferentes condições de estresse. Assim, estudaram-se os padrões transcricionais após a internalização das leveduras do fungo por macrófagos murinos, condição na qual o fungo está exposto ao estresse oxidativo, após a sua recuperação a partir de tecidos de animais infectados (Tavares *et al.*, 2007; Calich *et al.*, 2008), após exposição do fungo a inativação fotodinâmica (Almeida *et al.*, 2012), após exposição a drogas antifúngicas como itraconazol e sulfametoxazol (da Silva Neto *et al.*, 2014; Zambuzzi-Carvalho *et al.*, 2015); e também foi estudado o padrão de proteínas após estresse nitrosativo e após a internalização das leveduras do fungo por macrófagos (Parente *et al.*, 2015; Parente-Rocha *et al.*, 2015).

É importante ressaltar ainda que uma ação recente tem sido de grande relevância para a pesquisa relativa aos fungos do gênero *Paracoccidioides*. Trata-se do sequenciamento genômico de representantes dos principais fungos patogênicos dimórficos. A iniciativa do *Broad Institute of MIT and Harvard* (<http://www.broadinstitute.org/>) teve início em 2006, com o projeto "*Comparative genomes of Coccidioides and other Pathogenic Dimorphic Fungi*" em colaboração com o "*Dimorphic Fungal Genomes Consortium (DFGC)*", tendo como objetivo sequenciar com alta qualidade genomas de referência dos fungos dimórficos de importância médica, centralizar os dados e facilitar as análises comparativas. Considerando o contexto da época associado à carência de dados genômicos, outros dois pontos relevantes abordados pela iniciativa foram viabilizar a análise comparativa desses genomas e também dos fatores de virulência.

Foram sequenciados os genomas de duas linhagens de *Histoplasma capsulatum*, duas linhagens de *Blastomyces dermatitidis*, um isolado clínico de *Lacasia loboi* e as duas linhagens de *P. brasiliensis* (Pb03 e Pb18) e um isolado da nova espécie *P. lutzii* (Pb01). Como desdobramento dessas análises, Desjardins e colaboradores (2011) publicaram um estudo comparativo entre os três genomas do gênero *Paracoccidioides* (Desjardins *et al.*, 2011). Foram agrupadas 94% das sequências na montagem do genoma de Pb18 (espécie críptica S1) em cinco cromossomos, corroborando os resultados experimentais obtidos pela técnica de PFGE (cariotipagem molecular por eletroforese de pulsos alternados) (Cano *et al.*, 1998; Feitosa *et al.*, 2003). Foram realizadas análises comparativas entre os três genomas do complexo *Paracoccidioides* (Pb01, Pb03 e Pb18) e entre os fungos pertencentes à ordem Onygenales. As principais observações estiveram associadas à expansão da família de proteínas quinases FunK1, específicas do grupo de fungos, a perda da maioria dos genes envolvidos no metabolismo de carboidratos e a retenção no genoma da maior parte das proteases. Adicionalmente, foram explorados os elementos genéticos móveis observando-se uma expansão desses elementos em *P. lutzii* (Pb01). De uma forma geral, os dados e o conjunto de análises realizadas trouxeram à luz informações sobre o repertório gênico e fisiológico do gênero *Paracoccidioides* e dos fungos dimórficos.

Três anos após essa primeira iniciativa, os três genomas do complexo *Paracoccidioides* (isolados Pb01, Pb03 e Pb18) foram re-sequenciados pelo *Broad Institute*, agora utilizando a tecnologia NGS Illumina, já que a primeira versão foi gerada pela tecnologia de pirosequenciamento Roche 454. A versão 2 desses genomas trouxe ganho na qualidade das

reads geradas, maior acurácia na montagem dos contigs, fechamento de gaps, melhoramento da predição gênica, resolução de bases ambíguas e de regiões truncadas, identificação de SNPs e *indels*, sítios de *splicing* e anotação de vários genes relacionados a virulência em *Paracoccidioides* e de outros fungos como HSP90, RYP1-3, BAD1, catalase B, α -1,3-glucana sintase e a β -1,3-glucana sintase (Muñoz *et al.*, 2014).

2.5 Biologia de Sistemas

A Biologia de Sistemas é um campo interdisciplinar envolvendo componentes biológicos integrados de forma dinâmica. Esse conceito é empregado ao estudo e entendimento dos mecanismos biológicos nos diversos níveis de organização, que vão desde a caracterização das partes constituintes desses sistemas bem como suas interconexões, essenciais para a compreensão da biologia de um organismo como um todo. Tema atual, envolve métodos investigativos que abrangem e integram ensaios experimentais e computacionais em larga escala como análise de dados “omícos” (*genome-wide*, *proteome-wide* e *transcriptome-wide*), por exemplo. Tais abordagens têm como cerne a tentativa de compreender como a informação é propagada através dos sistemas em resposta a perturbações ambientais (Chuang *et al.*, 2010).

A abordagem *Knowledge base*, um conceito computacional aplicada no contexto da biologia de sistemas, consiste no delineamento *in silico* a partir de um conjunto de hipóteses, fatos e regras biológicas para a resolução de problemas. Além disso tal abordagem é utilizada para a integração da informação gerada por sequenciadores, bioinformática, técnicas bioquímicas, de biologia molecular, microbiologia, dentre outras, permitindo ir além de uma simples análise exploratória de dados. Nesse contexto, a biologia de sistemas, mostrou-se fundamental para orientar a construção de hipóteses, guiar desenhos experimentais, orientar abordagens de análises, dentre outros, de forma a obter resultados consistentes em um espaço de tempo menor e com custos reduzidos (Alterovitz e Ramoni, 2011)

2.6 RNASeq e análises computacionais

A biologia de sistemas de microrganismos têm se mostrado impactante e representativa. Particularmente em leveduras, o estudo dos sistemas de forma integrada foi pioneiro utilizando o gênero *Saccharomyces* como organismo modelo. O RNASeq (*RNA*

sequencing) é uma abordagem recente aplicada em análises do perfil transcricional por sequenciamento "profundo", *deep sequencing*. Essa associação vem da altíssima capacidade de vazão de dados que esta técnica promove. Incluída nas abordagens conhecidas como “*Next Generation Sequencing*” (NGS), esta técnica tem sido largamente aplicada aos estudos dos complexos transcriptomas de eucariotos pelas vantagens associadas à maior poder de precisão e sensibilidade quando comparada à abordagem de microarranjos, à capacidade de quantificar e detectar genes menos transcritos, à capacidade de detectar e distinguir isoformas e à reprodutibilidade de resultados (Wang *et al.*, 2009).

De uma forma geral, os principais passos para análise dos dados de RNASeq consistem em: a) desenho experimental; b) controle de qualidade; c) alinhamento das leituras; d) quantificação dos níveis de expressão genica e dos transcritos; e) visualização; f) análise dos genes diferencialmente expressos; g) análise de *splicing* alternativos; h) análise funcional; i) detecção de fusão gênica e; j) mapeamento iQTL (*Quantitative Trait Locus*). Além de todos esses passos, a integração dos dados a outras informações relacionadas a análises funcionais de genomas são fundamentais (Conesa *et al.*, 2016).

Nos primeiros estudos que incluíram dados de RNA-Seq (Marioni *et al.*, 2008), a distribuição de Poisson foi adotada por se tratar de dados de contagem, porém esse método assume que a variância é igual à média. Anders e Huber (2010) relataram que os dados de RNA-Seq podem apresentar maior variabilidade que aquela assumida pela distribuição de Poisson. Em situações na qual se envolvem dados de contagem, cuja variância excede a média, observa-se o fenômeno de superdispersão ocasionando uma subestimação do erro amostral ao se adotar Poisson (Anders e Huber, 2010). O conjunto de dados provenientes do RNA-Seq tem como características principais: a) dados de contagem; b) pequeno número de repetições; c) grande variedade de transcritos; d) bibliotecas de tamanhos diferentes e; e) presença de superdispersão, ou seja, a variância é maior que a média (Robinson e Smyth, 2007).

Sendo assim, o uso de métodos previamente estabelecidos é um ponto positivo, porém limitado, que requer novas implementações e estratégias para compor a orquestra de *pipelines* que alberguem as necessidades de cada organismo e que responda às diferentes perguntas biológicas. A exemplo disso, Robson e Smyth citam a distribuição Binomial Negativa (NB), hoje largamente utilizada nas análises de dados de RNA-Seq. Esse método assume que a variância é maior que a média permitindo um tratamento natural para a superdispersão por

meio da estimativa dos parâmetros dessa distribuição. Sendo assim, a NB atualmente tem sido considerada o método mais indicado para as análises de RNA-Seq (Robinson e Smyth, 2007; Robinson *et al.*, 2010)

Outro ponto sensível das análises de dados de RNASeq, é a demanda de dois pontos-chave: 1) associados à necessidade de um alto e fundamental poder de processamento computacional, uma vez que a escada de dados pode variar entre 10^6 - 10^9 leituras (*reads*) geradas pelo sequenciador e; 2) ao *know how* de bioinformática necessário às futuras análises. Um desdobramento de grande impacto, comum ao término da fase inicial de sequenciamento é a busca pela informação e conhecimento contidos nas sequência consenso geradas, e a sua integração com o conhecimento já existente. Segundo Robinson e colaboradores (2007), é desejável que nessa fase, estratégias que empreguem abordagens de estudo emergentes, visem à transformação do conhecimento genômico em estratégias de intervenção. A Biologia de Sistemas no conhecimento do mapa transcricional de microrganismos vem sendo aplicada em inúmeros cenários que inclui, mas não restringe, os fungos, a busca pelo melhor entendimento dos fatores associados à virulência para estratégias de tratamento e cura da doença, produção de metabólitos secundários para produção de fármacos, processos fermentativos para aplicação a agroindústria etc (Nielsen e Vidal, 2010; Papini *et al.*, 2010).

Especialmente em *Paracoccidioides*, Tavares e colaboradores (2015) realizam uma revisão dos estudos do transcrito desse organismo nas fases específicas micélio (M) e levedura (L) e também na transição M→L e L→M realizadas até a data da publicação. Nesse trabalho as técnicas aplicadas sempre foram tradicionais, como microarranjos. Entretanto o autor conclui que a necessidade de explorar esses transcritos por tecnologias de nova geração são necessárias, como estratégias de RNASeq para estudos de virulência e dimorfismo e Duo-RNASeq nos estudos da interação patógeno-hospedeiro (Tavares *et al.*, 2015).

No contexto da biologia de sistemas, Lima e colaboradores (2014) apresentam um panorama da resposta de *Paracoccidioides* ssp., em diferentes níveis de regulação (transcritoma e o proteoma) frente ao hospedeiro, mediante a privação de carbono (Lima *et al.*, 2014). Bailão e colaboradores (2015), utilizam RNASeq para estudar as vias metabólicas de assimilação de Fe^{+2} (ion ferro) e Fe^{+3} (ferro férrico) dos isolados Pb01 e Pb18. O estudo reforçou que a captação de ferro é essencial para quase todos os organismos e revelou novas

moléculas potenciais alvos para desenvolvimento de drogas que atuem no bloqueio da absorção de ferro e nas rotas de internalização de drogas inibindo a proliferação do organismo e no desenvolvimento de vacinas (Bailão *et al.*, 2015). E por ultimo, o trabalho de Araújo e colaboradores (2016) avaliaram a resposta de *Paracoccidioides* ssp. na presença da droga argenilactona. Os autores investigaram os efeitos desse antimicrobiano no perfil transcricional, em especial, dos genes envolvidos no modelamento da parede celular e do estresse oxidativo. Os autores concluem a partir desses estudos, que o antimicrobiano é capaz de agir na biossíntese da parede celular e também induzir o estresse oxidativo, e dessa forma, uma alternativa em potencial ao tratamento da PCM (Araújo *et al.*, 2016).

Os estudos referentes ao perfil de expressão genica do complexo *Paracoccidioides* por abordagem NGS, são recentes e desafiadores. Entretanto é a abordagem mais poderosa e atual empregada no universo da transcritômica. As análises aqui apresentadas, das duas fases específicas do fungo, micélio e levedura, no contexto da biologia de sistemas e por abordagem NGS é inédita. Ressalta-se ainda, dentro desse panorama, que associada a técnicas de NGS a utilização de um modelo de *P. brasiliensis* defectivo no dimorfismo térmico, tem o potencial de ampliar os estudos comparativos e a compreensão fundamental sobre o dimorfismo térmico desse organismo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar um isolado de *Paracoccidioides brasiliensis* defectivo na transição termomórfica por meio de uma abordagem de biologia de sistemas, integrando técnicas microbiológicas, bioquímicas e de bioinformática de modo a contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos da morfogênese desse fungo patogênico.

3.2 Objetivos específicos

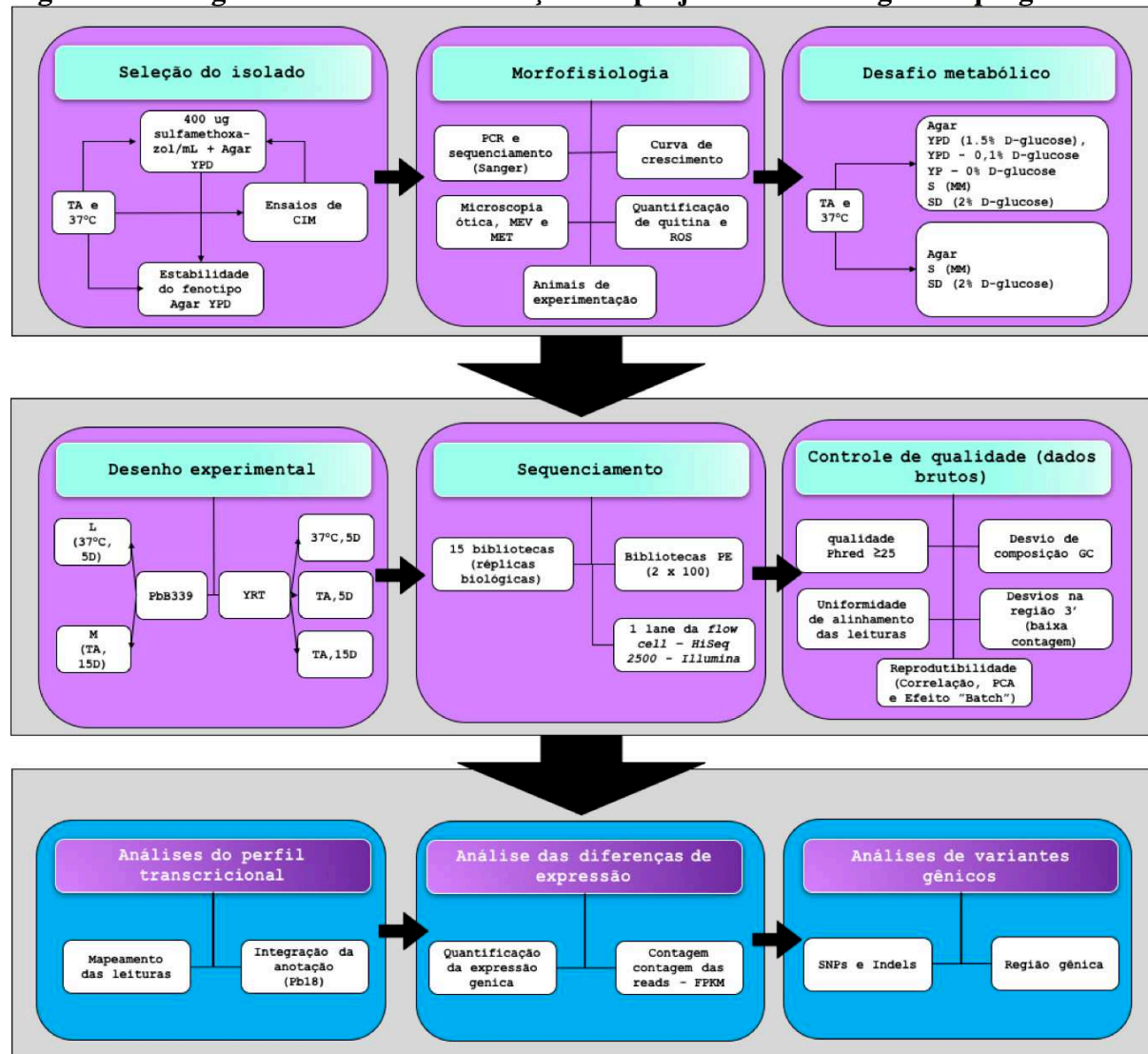
- Selecionar, a partir do isolado clínico Pb339 de *P. brasiliensis*, e com base em observações prévias do grupo de pesquisas, um isolado alterada ou defectiva na transição dimórfica, leveduriforme à temperatura ambiente.
- Verificar a identidade do isolado alterada, isolado YRT, por meio de marcadores moleculares espécie-específicos para *P. brasiliensis*
- Caracterizar morfológica e fisiologicamente a isolado YRT empregando técnicas de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura e transmissão, curvas de crescimento, perfis de susceptibilidade a antimicrobianos, sobrevivência em animais de experimentação.
- Investigar na isolado YRT o perfil de expressão de genes previamente descritos na literatura como diferencialmente expressos, principalmente aqueles potencialmente relevantes na fase leveduriforme, parasitária.
- Sequenciar o transcrito do isolado Pb339 e isolado YRT de *P. brasiliensis* pelo método *high-throughput* RNA-Seq sob diferentes condições de temperatura e tempo de cultivo.
- Quantificar e comparar os perfis transcricionais do isolado Pb339 e do isolado YRT nas condições empregadas.
- Avaliar os variantes gênicos no isolado YRT.
- Desenvolver scripts e métodos que empregam tecnologia relacional para integração dos dados e extração da informação biológica útil.
- Investigar e concentrar as análises dos resultados nos genes diferencialmente expressos relacionados ao dimorfismo térmico, fatores de virulência

4 METODOLOGIA E DESENVOLVIMENTO
EXPERIMENTAL

4.1 Desenvolvimento experimental

Para cada objetivo específico apresentaremos a metodologia empregada. O fluxograma a seguir (Figura 3) apresenta, da esquerda para a direita e de cima para baixo, as ações realizadas no desenvolvimento do projeto e a metodologia empregada visando alcançar os objetivos específicos propostos.

Figura 3. Fluxograma consolidado das ações do projeto e metodologias empregadas



4.2 Manutenção do isolado Pb339 de *Paracoccidioides brasiliensis*

Nesse trabalho foi utilizado o isolado clínico Pb339 (ATCC32069) da espécie *P. brasiliensis* (espécie filogenética S1) (Matute *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2009; Theodoro *et al.*, 2012) mantido no laboratório de Biologia de Microrganismos (ICB/UFMG) em Ágar

YPD (Yeast Peptone D-glucose), com modificações, em sua forma M à TA, com subcultivos bimestrais. Por se tratar de um fungo dimórfico, visando a obtenção da forma L incubou-se o isolado em temperatura controlada de 37°C em estufa (BOD), para completa conversão; a manutenção na forma L foi realizada com subcultivos semanais. A amostra do isolado Pb339 foi cedida pelo Dr. Zoilo Pires de Camargo (Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, UNIFESP), descrita como tendo sido originalmente isolada de um paciente com PCM crônica progressiva, em São Paulo (Brasil) e mantida em laboratório desde a década de 1960 (Calcagno *et al.*, 1998; Matute *et al.*, 2006) Um aspecto importante da biologia desse isolado foi o seu emprego sistemático na produção e caracterização de antígenos para diagnóstico sorológico da PCM e por seu padrão de separação de bandas cromossômicas bem definido em eletroforese de campo pulsado (PFGE) (Puccia *et al.*, 1986; Camargo *et al.*, 1988; Cano *et al.*, 1998). Tais características fazem desse isolado uma amostra de referência muito utilizada em pesquisas relacionadas ao fungo (Cisalpino *et al.*, 1996; Morais *et al.*, 2000; Matute *et al.*, 2006; Carrero *et al.*, 2008; Puccia *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2009; Queiroz Júnior *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2014).

- **Meio de cultura Yeast Peptone D-glucose (YPD) 1,5%**

Extrato de levedura.....5,0 g
Peptona caseína.....10 g
D-glucose15 g
H₂O.....q.s.p. 1.0 L
pH 7,0

*Para obter o meio sólido adicionar 15g de Ágar bacteriológico.

*Esterilizar em autoclave à temperatura de 121°C por 15 minutos.

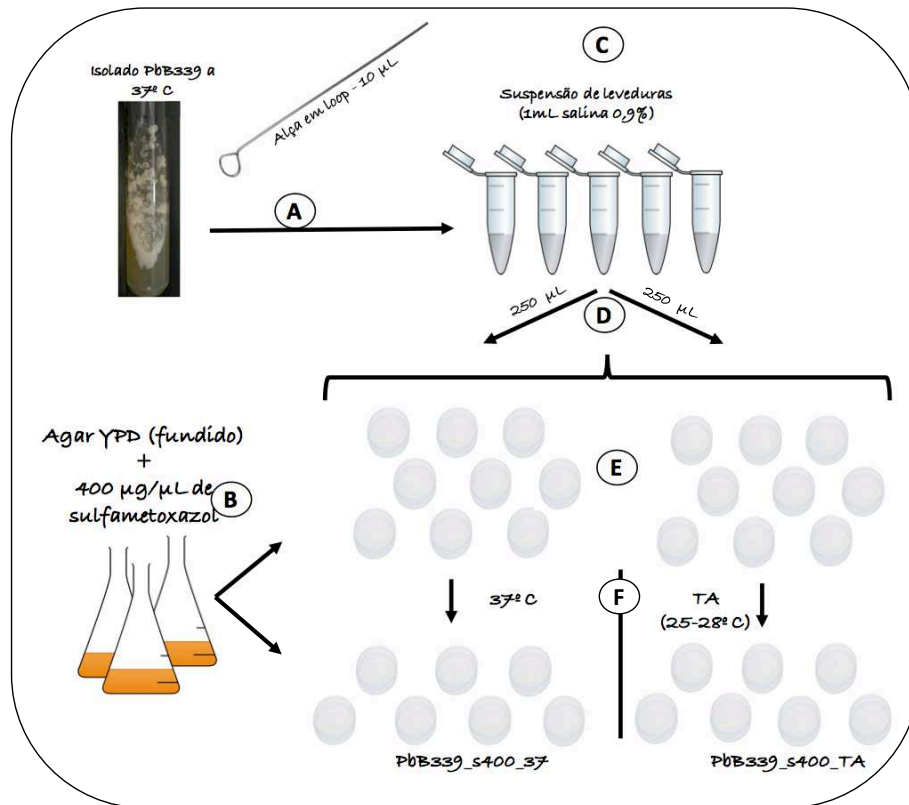
4.2.1 Seleção e manutenção do isolado Pb339 na presença da droga sulfametoxazol

A seleção do isolado defectivo na transição dimórfica, foi realizado segundo o descrito por Cruz (2011), com modificações. Para a seleção empregou-se o Ágar Yeast Peptone D-glucose (YPD) adicionado de 400 µg/mL de sulfametoxazol, pela técnica de múltiplos passos. Com uma alça em loop de 10µL retirou-se amostra do cultivo leveduriforme do isolado Pb339 (ATCC32069) da espécie *P. brasiliensis* (espécie filogenética S1), suspendeu-se em 1 mL de solução salina 0,9% estéril, homogeneizou-se em

vortex (rotação máxima, 30”), inoculando-se 250 µL (8,0 x 10⁸ cel/mL), espalhando-se com alça em “L” estéril. Após a seleção, avaliou-se a estabilidade do fenótipo dos isolados na presença e ausência de sulfametoxazol, nas temperaturas ambiente e a 37°C, subcultivando-se a cada 7 dias, por 10 repiques sucessivos (Figura 4).

Figura 4. Desenho esquemático do método de seleção de linhagens com alteração no dimorfismo térmico.

Em A e C – a cada tubo de 2mL adicionou-se 1mL de salina 0,9% e inoculou-se 1 alça de 10µL da cultura leveduriforme do isolado Pb339. Em B – Ágar YPD fundido e acrescido de 400µg/mL de sulfametoxazol; o meio foi vertido em 50 placas de Petri (20mL/placa). Em D e E – uma alíquota de 250 µL da suspensão de leveduras foi inoculada em cada placa e as alíquotas foram espalhadas com o auxílio de alça em L. Em F –placas incubadas a 37° C e 25 placas incubadas à TA.



As culturas que apresentaram morfologia estável L à TA, na ausência de sulfametoxazol, foram mantidas e as que apresentaram reversão para micélio foram descartadas. Ao final do processo foi selecionado um isolado com fenótipo estável e denominado YRT (*yeast at room temperature*). As culturas YRT estão sendo mantidas até o momento, incubadas a 37°C e a TA, na presença de 400 µg de sulfametoxazol e também na ausência da droga, com repiques semanais. Realizou-se a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do isolado selecionado, frente a diferentes antimicrobianos, segundo Cruz e colaboradores (Cruz, 2011; Cruz *et al.*, 2012) com modificações (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos antimicrobianos utilizados nos ensaios de CIM

Antimicrobiano	Forma utilizada	Solvente	Armazenamento	Solução estoque	faixa intervalar (mg/mL)	Fabricante
Anfotericina B	Pura	DMSO PA (Synth)	4°C	1 mg/mL	0,0078-4,0	Sigma
Itraconazol	Pellet	DMSO PA (Synth)	*	1 mg/mL	0,0039-2,0	Farm. de Manipulação da Fac. de Farmácia da UFMG
Cetoconazol	Pura	DMSO PA (Synth)	*	1 mg/mL	0,0019-1,0	Farm. de Manipulação da Fac. de Farmácia da UFMG
Fluconazol	Pura	Água destilada	*	1 mg/mL	0,0078-4,0	Farm. de Manipulação da Fac. de Farmácia da UFMG
Sulfametoxazol-Trimetoprim	Comercial - Bactrim®	DMSO PA (Synth)	*	5mg/mL	1.17-600	Roche
Sulfametoxazol	Pura	DMSO PA (Synth)	*	1 mg/mL	1.17-600	Sigma
Terbinafina	Pura	DMSO PA (Synth)	*	1 mg/mL	0,0078-4,0	Novartis

* preparar no momento do ensaio

4.3 Cinética de crescimento e viabilidade celular do isolado YRT

Em frascos de 250 mL contendo 100 mL de caldo YPD inoculou-se uma alça em *loop* (calibrada) de 10 µL das culturas de Pb339 L e YRT (T.A. e 37°C), de modo a manter um inóculo reprodutivo. Em seguida, as mesmas foram subcultivadas a cada 5 dias, por 4 vezes, incubadas à T.A. e a 37°C, sob agitação constante 120 rpm. Após esse intervalo o último subcultivo foi utilizado para a determinação da cinética de crescimento com base em método turbidimétrico. As culturas foram avaliadas diariamente por meio da retirada de uma alíquota do sobrenadante e sua densidade óptica (DO) lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm, no qual 70% de transmitância (λ) equivale a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL (Hahn *et al.*, 2002). Todo o ensaio foi realizado em triplicatas, considerando-se a média dos resultados registrados (Restrepo e Jiménez, 1980; McGowan e Buckley, 1984).

4.4 Caracterização morfológica por Microscopia

4.4.1 Microscopia ótica

Sucessivamente, observaram-se por microscopia ótica, os aspectos morfológicos do isolado parental Pb339, nas fases L e M, e do isolado atípico YRT, cultivados tanto à TA quanto a 37°C, em meio YPD sólido e líquido, documentando-se os aspectos relevantes (equipamento Leica de microscopia ótica com câmera digital acoplada, modelo DM750; ensaios e a documentação gráfica realizados no Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras, Departamento de Microbiologia ICB/UFMG, com a colaboração e autorização do Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa). Foram preparadas alíquotas dos diferentes cultivos, em intervalos de 2, 5, 7, 10 e 15 dias e, para observação adicionou-se 5 µL de solução lactofenol-azul de algodão, observando-se em aumentos de 400X e 1000X (com o auxílio de óleo de imersão).

4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET)

As amostras foram preparadas no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI), ICB/UFMG, e tanto a microscopia eletrônica de varredura (MEV) quanto a de transmissão (MET) foram realizadas no Centro de Microscopia da UFMG (CM-UFMG). a partir de amostras cultivadas em Ágar YPD e fixadas com 5 dias de crescimento, tanto quando cultivadas à TA ou a 37° C.

A MEV foi realizada em equipamento JEOL JSM - 6360LV e o preparo das amostras seguiu as etapas de fixação em glutaraldeído 2% (em tampão fosfato 0.1M, pH 7.3), 24 horas a 4°C; fixação em lamínula com poly-L-lisina, secagem estufa a 60°C, seguida de lavagem com OsO4 1% (tetróxido de ósmio) em tampão 0,1 M e ácido tânico a 1% sucedendo-se a desidratação das amostras por imersão em concentrações crescentes de etanol (30°, 50 – 70°, 80 – 95° e 100°), repetindo-se cada passo 2 vezes, e finalmente, secagem em aparelho de ponto crítico (CO2) e banho de ouro (metalização) sobre suporte de alumínio (Haddad *et al.*, 2007).

A técnica de MET foi realizada no equipamento Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI - 120 kV e as amostras foram preparadas de acordo as seguintes etapas: a) Inclusão das células

livres em Agarose - As células previamente fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M foram lavadas, centrifugadas, e incorporadas na proporção de 3:1 em Agarose a 4% Resultados 16 fundida. As amostras foram armazenadas a 4° C overnight para solidificação; b) Inclusão das células em araldite - As amostras incluídas em Agarose foram imersas em glutaraldeído (grau I) 2,5% (opção: glutaraldeído 4-5% (grau II)) em tampão fosfato/ cocodilato 0.1M, pH 7.3, no intervalo de 1-6h, e imersas novamente em novo tampão fosfato/cocodilato por 1 hora, com mais duas trocas. As amostras foram deixadas overnight imersas em tampão novo, lavadas em OsO4 1% e KFeCN (ferrocianeto de potássio) 1,5% em água destilada, 60-90 min e lavadas rapidamente em água destilada. Desidratou-se em concentrações crescentes de etanol (35° e 50° por 15 min, 70° e 85° por 20 min, 95° por 20 min, por duas vezes, e álcool PA durante 20 min, repetindo-se esse último passo por três vezes); procedeu-se com o método de infiltração em resina, distribuindo-se o material em moldes, incubando-se em estufa a 45°C, overnight, e a 60°C por, no mínimo, 24 horas para a solidificação da resina. c) Corte semi-fino e ultrafino e contrastação com uranila e citrato de chumbo - Obs. Os fragmento de no máximo 2mm de espessura. Após inclusão em araldite os blocos foram submetidos a seção de cortes ultrafinos com o auxílio do ultramicrotomo modelo Sorvall, MT2-B Ultramicrotome (Du Pont Instruments). d) Contrastação com uranila e citrato de chumbo - Os cortes ultrafinos foram recolhidos e colocados em tela de cobre com a face voltada para cima, e para intensificar o contraste, adicionou-se uma gota de solução uranila 2% filtrada. O material foi coberto com uma lamina de vidro, levado à estufa a 60°C por 8 a 10 min, lavando-se, em seguida, com água destilada isenta de CO2 (ferver a água destilada por 10 min e tampá-la ainda quente). Adicionalmente revestiu-se previamente uma placa de Petri com parafina (opção: cera de dentista), acrescentou-se de 5 a 10 pastilhas de NaOH, para diminuir a concentração de CO2, aguardando-se por alguns segundos. Sobre a placa contendo parafina, adicionaram-se gotas da solução Reynolds (filtrada), e cada tela foi colocada com a face da amostra voltada para a solução, cobrindo-se a placa por 5 min. Lavaram-se as telas com NaOH 0,01 N e água destilada isenta de CO2, secando-as com o auxílio de papel filtro (ou em estufa) (Haddad *et al.*, 2007).

4.5 Identificação molecular do isolado YRT

A identificação molecular do isolado YRT foi necessária em função de não apresentar as características morfológicas usualmente úteis para identificar o gênero *Paracoccidioides*

(células leveduriformes com multibrotamentos, conhecida em rodas-de-leme e a conversão termodimórfica reversível entre as fases de micélio e levedura). Nesse ensaio, utilizaram-se os isolados Pb18 e Pb339 (*P. brasiliensis*), os isolados Pb01, ED01, 1578 (*P. lutzii*), e o isolado atípico YRT selecionado a partir de Pb339.

4.5.1 Obtenção da massa celular

Para a obtenção de massa celular induziu-se a conversão das colônias filamentosas para leveduras, por inoculação em ágar YPD incubando-se a 37°C. As culturas em fase L dos isolados e do isolado YRT (a TA e 37°C) foram submetidas a 3 subcultivos sucessivos a intervalos de 5 dias para indução do crescimento exponencial (San-Blas e San-Blas, 1994). Após esse intervalo os cultivos foram centrifugados a 6000 rpm, por 10 min a 5°C (Centrifuga JouanBR4i), lavados por três vezes com água milliQ estéril.

4.5.2 Lise celular, extração e quantificação do DNA

As etapas executadas para a identificação molecular do gênero *Paracoccidioides* envolveram a extração e avaliação qualitativa e quantitativa do DNA genômico (Green e Sambrook, 2012). As reações de amplificação em cadeia da polimerase (PCR convencional e Nested PCR) e sequenciamento dos produtos das regiões hipervariáveis ITS e NL do gene da subunidade ribossomal menor (identificação de gênero) e do segmento amplificado do gene gp43 (antígeno imudominante de *P. brasiliensis*, identificação espécie-específica). Empregaram-se também iniciadores para amplificação por PCR de marcadores espécie-específicos, como Trem E e a região indel hsp70, sendo estes marcadores de *P. lutzii* (Pb01), e Trem G como marcador de *P. brasiliensis*. Os iniciadores empregados nessa análise foram aqueles previamente descritos na literatura, apresentados e referenciados na Tabela 2 (Girardin, 1994).

Tabela 2. Detalhamento dos oligonucleotídeos utilizados no ensaio de PCR.

Iniciadores	Sequências	Tamanho dos amplicons em pares de base	Temp. anelamento/ Concentração de MgCl ₂	Referências
TIR TremE - F/R	5'GTAATCCACACCGAGTCG3'	1883	53° C/2.5mM	<i>Marini et al, 2010.</i>
TIR TremG - F TIR TremG - R	5'ATGATCTTTGGTGCTGCCA3' 5'TGGTGGCATTACATAAATGC3'	1357	55° C/2.5mM	
Indel hsp70 - F Indel hsp70 - R	5'AACCAACCCCTCTGTCTTG3' 5'GAAATGGGTGGCAGTATGGG3'	400	55° C/2.5mM	<i>Teixeira et al, 2009.</i>
ITS 1 - F ITS 4 - R	5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3' 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'	613	55° C/2.5mM	<i>White et al, 2000.</i>
NL1 NL4	5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3' 5'GGTCCGTGTTCAAGACGG3'	600	54° C/2.5mM	<i>Lachance et al, 1999.</i>
GPI F* GPII R* GPIII F* GPIV R*	5'AACTAGAATATCTCACTCCCAGTCC 3' 5'TGTAGACGTTCTTGTATGTCTTGGG3' 5'GATCGCCATCCATACTCTCGCAATC3' 5'GGGCAGAGAAGCATCCGAAATTGCG3'	355 196	50,0° C/ 2,5mM 72,0° C/ 2,5mM	<i>Bialek et* al, 2000.</i>

*Nested PCR

Obs.: Para a reação de amplificação das regiões NL acrescentou-se à reação 1,0 µL dimetil-sulfóxido (DMSO) PA (SIGMA™, USA), 2,0 µL de betaína PA e a concentração de 140 ng/µL a de gDNA. Para a reação de amplificação da região ITS a concentração de gDNA utilizada foi de 250 ng/µL.

4.5.3 Reação em cadeia da polimerase

Os iniciadores Tir TremE, Tir TremG, hsp70, ITS e NL foram utilizados nas reações de PCR convencional. Para a amplificação do gene gp43 utilizou-se a técnica de nested PCR descrita por Bialek e colaboradores (Bialek et al., 2000). Utilizou-se para o mix da reação da PCR convencional 2U (0,2 µL) da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen®Taq Platino), tampão de amostra 10X (5µL), MgCl₂ 1,5mM (1,5 µL), mistura de dNTPs 0,2 mM (1 µL), iniciadores a 5pmol/µL (1 µL), 10 ng/µL de gDNA para o volume final de 50 µL completado com água livre de DNase e RNase. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador Veriti®96-Well ThermalCycler (*Applied Biosystems*). A Tabela 3 apresenta as condições de amplificação utilizadas em cada reação.

Tabela 3. Condições de amplificação empregadas na técnica de PCR convencional

Iniciadores	1 Ciclo	35 Ciclos			1 Ciclo
	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final
Tir TremE			55° C - 1 min	72 - 2 min	
Tir TremG			55° C - 1 min	72 - 2 min	
indel hsp70	94° C - 5 min	94° C - 1 min	60° C - 1 min	72 - 1 min	72° C - 5 min
ITS			55° C - 1 min	72 - 1 min	
NL			54° C - 25 seg	72 - 20 seg	

min = minutos
seg = segundos

As condições de amplificação para o gene gp43 e a nested PCR (Bialek *et al.*, 2000) estão apresentadas Tabela 4 a seguir.

Tabela 4. Condições de amplificação empregadas na técnica de Nested PCR

Iniciadores	1 Ciclo	35 Ciclos			1 Ciclo
	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final
gp43 (externa)	94° C - 5 min	94° C - 30 seg	50° C - 30 seg	72 - 1 min	72° C - 5 min
gp43 (interna)		94° C - 1 min	68° C - 30 seg		

min = minutos
seg = segundos

Alíquotas dos produtos amplificados foram homogeneizadas em tampão de amostra 6X (Blue/Orange LoadingDye - PROMEGA®) (2µL) e GelRed 20X (1µL), resolvidas em gel de Ágarose 0,8% (Sigma-Aldrich®), visualizadas com o auxílio de luz ultravioleta (UV) e documentadas pelo equipamento ChimiDoc MP System™ BIO-RAD. Os marcadores de peso molecular utilizados foram de 100pb e 1 Kb ladder (0.01 µg/µL) PROMEGA®. Realizou-se a purificação do produto da PCR para a remoção de iniciadores e dNTPs remanescentes da reação empregando o kit comercial Pure Link®PCR Purification (Invitrogen®). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing e o sequenciador ABI 3730 DNA Analyzer (Life Technology™). A qualidade dos dados brutos gerados pelo sequenciamento foi conferida com a ferramenta fastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) (Version 0.11.3). A chamada de qualidade dos dados (basecalling), a montagem e a geração das sequencias consenso foram realizadas pelo pacote Phred Phrap Consed (PPC) (Ewing and Green, 1998). Considerou-se

um valor de qualidade Phred ≥ 20 , que representa um valor de confiança de 99% (Ewing e Green, 1998).

4.6 Ensaios de detecção de ROS (Espécies Reativas de Oxigênio) e de quantificação de quitina na parede celular

Foram realizados ensaios para a detecção de ROS (espécies reativas de oxigênio) e de quantificação de quitina nas paredes celulares pois são capazes de revelar aspectos fisiológicas e estruturais característicos da fase de leveduras e que as distinguem da fase micelial. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, adicionando-se a cada poço 50 μL de uma suspensão de 1×10^6 células/mL de PBS. Adicionou-se meio RPMI (sem vermelho de fenol) incubando-se com a sonda H 2 DCF-DA (Invitrogen) na concentração de 50 μM , 30 min a 37°C, sob abrigo da luz. A fluorescência foi determinada em fluorímetro (Synergy 2, BioTek, USA), comprimento de onda de excitação 485 nm e emissão de 530 nm (Baltazar *et al.*, 2015). Para a quantificação de quitina, as células foram incubadas com calcofluor (Sigma) na concentração de 0.25 $\mu\text{g/mL}$, diluído em PBS/BSA 1% por 30 min, a 37°C, sob o abrigo da luz. Seguiu-se a lavagem por 2x com PBS e leitura em fluorímetro (Synergy 2, BioTek, USA), comprimento de onda excitação de 340 nm e emissão de 440 nm. Para as análises estatísticas desses ensaios utilizou-se one-way ANOVA e Kruskal-Wallis and Newman-Keuls para o teste de múltiplas comparações. Os valores $p < 0.05$ foram considerados significativos.

4.7 Ensaio de infecção animal para verificar a sobrevivência do isolado YRT em modelo experimental de PCM

Como o isolado atípico sobreviveu a 37°C, em cultivo artificiais, tornou-se importante avaliar se este isolado seria também capaz de sobreviver à inoculação em animais de experimentação, e se caso sobrevivesse sendo reisolado, se manteria o fenótipo atípico L à TA. Para tanto, realizou-se ensaio de infecção experimental em camundongos com as seguintes etapas: a) Animais de experimentação - camundongos isogênicos machos do isolado C57BL/6, com 20-30 gr. de peso, 6-8 semanas de idade, obtidos no Centro de Bioterismo do ICB/UFMG (CEBIO/ICB/UFMG) e mantidos no Laboratório de Interação

Micro- organismo/Hospedeiro (LIMHO) do ICB/UFMG. Os camundongos foram agrupados em seis animais por gaiola. Os procedimentos abordados neste estudo estão de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), sob número de protocolo 163/2012. b) Cultivo e manutenção dos isolados de *P. brasiliensis* - foram utilizadas os isolados Pb18, Pb339, YRT_37_5D (YRT Resultados 19 cultivado a 37°C) e YRT_TA (YRT cultivado à TA), da coleção do LIMHO. A amostra Pb18 é conhecida por sua virulência em modelos experimentais de infecção e foi utilizada como controle positivo do experimento. Os isolados fPb18 e Pb339 foram mantidos em Ágar YPD em estufa incubadora BOD (TE-371 – Tecnal) a 37°C, com repiques semanais. O isolado YRT foi mantido em Ágar YPD à TA. Antes dos experimentos, foram repicados para caldo YPD e incubados a 37°C em estufa, com agitação orbital (TE-420 – Tecnal), durante sete dias. c) Preparo do inóculo fúngico – as células fúngicas foram lavadas com solução salina tamponada (PBS) estéril e centrifugadas (8013 x g, cinco min) (Centrífuga Jouan BR4i, Jouan, Winchester, VA, USA). Depois da última lavagem, foram adicionados cinco mL de PBS estéril, as partículas maiores sedimentadas pela gravidade, e a porção superior contendo leveduras isoladas foi coletada. A viabilidade das células foi determinada utilizando o corante Verde Janus (Sigma) e a contagem das leveduras feita em câmara de Neubauer (Sano et al., 1993). A concentração foi ajustada para 1x10⁶ células em 30 µL de suspensão fúngica antes da inoculação, empregando-se culturas que apresentaram pelo menos 85% de viabilidade. d) Infecção pulmonar por inoculação intranasal (i.n.) dos isolados - antes da inoculação, todos os camundongos foram anestesiados com uma solução de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) (Syntec) em PBS pela via intraperitoneal (i.p.). Aproximadamente 10 min após a administração desta solução, os camundongos foram submetidos à inoculação por instilação intranasal do fungo com 30 µl da suspensão fúngica (1x10⁶ leveduras/animal). Como controle negativo, os animais receberam 30 µL de solução PBS estéril pela mesma via. e) Determinação de unidades formadoras de colônia (UFC) nos pulmões - Após 3 dias de infecção, os animais foram eutanasiados e o lóbulo superior direito do pulmão foi removido e pesado. Em seguida, os fragmentos pulmonares foram macerados e homogeneizados em PBS estéril. Aliquotas de 100 µL dessa suspensão foram semeadas, em duplicata, com auxílio de alça de Drigalski, em placas de Petri (J-Prolab), contendo Ágar infusão de cérebro e coração (BHI, Difco), suplementado com 5% de fator de crescimento (filtrado de cultura de células leveduriformes do isolado Pb339 e sua isolado YRT de *P. brasiliensis*), 4% de soro fetal bovino e 40 mg/L de gentamicina (Castaneda et al., 1988; Kurita et al., 1993). Em seguida, as placas foram

vedadas com parafilme e incubadas em estufa incubadora BOD (TE-371 – Tecnal), sob câmara úmida a 37°C. As colônias foram contadas após 15 dias de crescimento e o resultado expresso em número de UFC por g de tecido. f) Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO) - O acúmulo de neutrófilos no tecido pulmonar foi avaliado por meio do ensaio de atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), o que permite indicar indiretamente o infiltrado neutrofílico no sítio de infecção (Souza et al., 2000). Os resultados foram expressos em unidades relativas Resultados 20 de acordo com uma curva-padrão de neutrófilos purificados (> 95% pureza) da cavidade peritoneal de camundongos estimulados com caseína 5%. g) Avaliação da atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG) - O acúmulo de macrófagos no tecido pulmonar foi avaliado pelo ensaio de atividade da enzima NAG conforme Barcelos e colaboradores (Barcelos et al., 2005). Os resultados foram expressos em número relativo de macrófagos em 100 mg de tecido. h) Análise estatística - A análise estatística e a construção dos gráficos foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram determinadas através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo método pós-teste de Newman-Keuls. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média. Todos os dados foram considerados estatisticamente significantes para um nível de $p < 0,05$.

4.8 Ensaio de estabilidade do fenótipo YRT, à TA e as 37°C, em diferentes condições nutricionais (meios de cultura) e físico-químicas

4.8.1 Ensaio de crescimento em Ágar YPD (1,5% D-glucose) na ausência de sulfametoxazol

Avaliou-se a estabilidade do fenótipo do isolado YRT (L à TA) na ausência da droga sulfametoxazol, cultivando-se as amostras em Ágar YPD na sua ausência, testando-se a estabilidade na temperatura ambiente e a 37° C (Figura 5):

- 1) Em cada tubo contendo salina 0,9% foi ressuspensa e homogeneizada uma amostra coletada em alça de 10µL do cultivo Pb3339_S400 e, dessa suspensão, inocularam-se 12-15 alíquotas de 10µL (spots) sobre o meio de cultura sem a droga. Aguardou-se

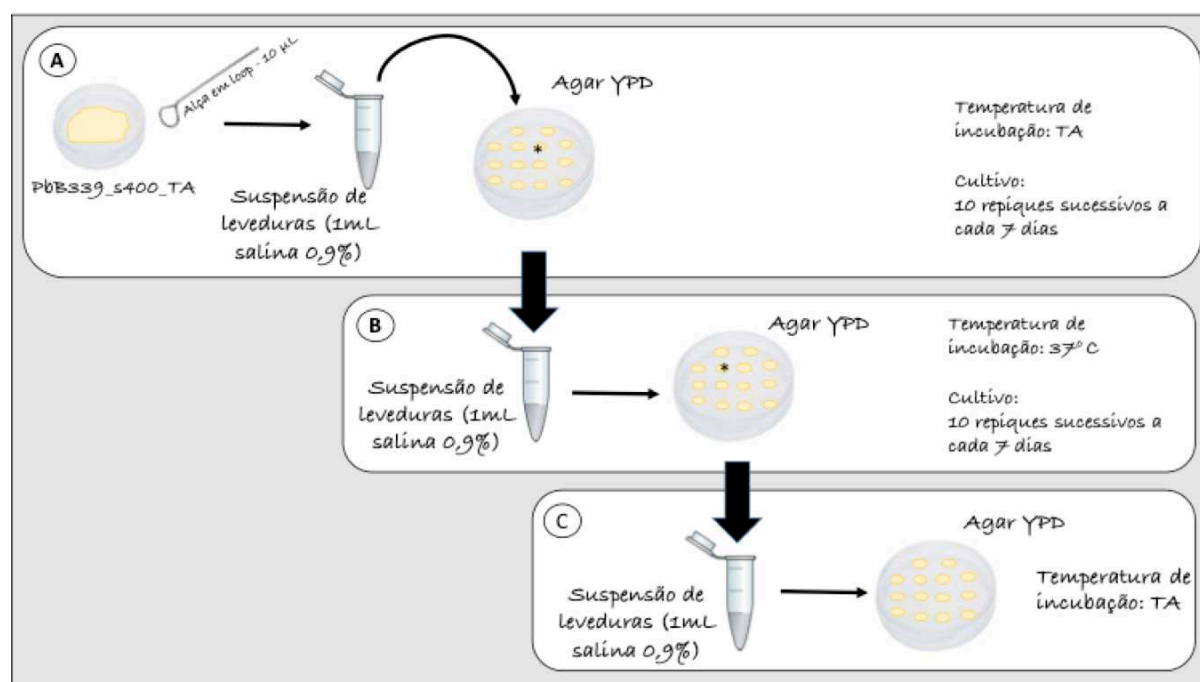
pela secagem das placas, vedou-se com parafilme e incubou-se à TA (Figura 5A). As amostras foram subcultivadas a cada 7 dias durante 10 repiques sucessivos e os exemplares que apresentaram morfologia L à TA (YRT- TA), na ausência da droga, foram mantidos.

A partir das amostras YRT selecionadas escolheram-se aleatoriamente 5 placas que foram subcultivadas a cada 7 dias durante 10 repiques sucessivos em YPD na ausência de sulfametoxazol, testando-se por incubação a 37° C (YRT_37) (Figura 5B). Sucessivamente, as amostras foram novamente subcultivadas à TA, no meio YPD na ausência da droga, averiguando-se a manutenção da morfologia leveduriforme (Figura 5C).

As culturas que apresentaram morfologia L à TA na ausência de sulfametoxazol após as variações de temperatura, foram mantidas e as que apresentaram reversão, descartadas.

Figura 5. Desenho esquemático do método de seleção do isolado com alteração no dimorfismo térmico na ausência da droga sulfametoxazol.

Em **A** – Em tubos de 2mL adicionou-se 1mL de salina 0,9% e inoculou-se 1 alça de 10 μ L da cultura de levedura de Pb339_S400_TA crescida em sulfametoxazol a TA. Verteu-se 20 mL de Ágar YPD sem a presença da droga em 20 placas de Petri. A suspensão de leveduras foi homogeneizada em vórtex e aguardou-se por 3 minutos para que grumos maiores sedimentassem. Do sobrenadante foram retiradas alíquotas de 10 μ L e inoculadas ao meio. As amostras foram incubadas a TA e subcultivadas a cada 7 dias durante 10 repiques sucessivos. Em **B** – Com a mesma metodologia descrita em **A**, as culturas L previamente selecionadas a TA foram incubadas a 37 $^{\circ}$ C e subcultivadas a cada 7 dias durante 10 repiques sucessivos. Em **C** – Após os subcultivos a 37 $^{\circ}$ C as amostras que apresentaram crescimento, foram novamente subcultivadas a TA.



4.8.2 Ensaios de crescimento em caldo YPD (1,5% D-glucose)

Nesses ensaios utilizaram-se frascos de 250 mL contendo 100 mL de caldo YPD. Uma alça em loop de 10 μ L, de cada uma das culturas mantidas à T.A e a 37 $^{\circ}$ C em Ágar, foram retiradas, inoculadas em caldo e incubadas à T.A e 37 $^{\circ}$ C, respectivamente. As culturas foram submetidas a agitação em shaker com movimento orbital, a 120 rpm. Após cinco subcultivos semanais as culturas mantidas à T.A foram expostas a 37 $^{\circ}$ C e as mantidas a 37 $^{\circ}$ C foram expostas à T.A durante 5 repasses semanais.

Um rigoroso controle foi feito para avaliar possíveis contaminações com bactérias e outros fungos e, principalmente, se nas culturas líquidas havia presença de formas M do

fungo. A cada repasse, 250 µL do sobrenadante das culturas líquidas foram inoculados em ágar YPD, espalhados com alça em "L", incubadas a T.A e observadas diariamente quanto à morfologia.

4.8.3 Ensaios de crescimento na omissão de componentes do meio YPD

Esse ensaio foi realizado com base na metodologia de Buu e colaboradores (2014) com modificações (Buu e Chen, 2014).

- **Meios de cultura sólido:**

- I) YP – Extrato de levedura 1% e peptona 2% e Ágar 1,5%.
- II) YD – Extrato de levedura 1% e D-glucose nas concentrações 1,5%, 0,1% e Ágar 1,5%.
- III) PD – Peptona 2% e D-glucose nas concentrações 1,5%, 0,1% e Ágar 1,5%

*Completar para 1 L com água destilada, autoclavar 15 minutos e resfriar para 65° C.

Uma alça de 10 µL de inóculo foi homogeneizada previamente em salina 0.9%, aguardou-se por 2-3 minutos pela sedimentação dos grumos maiores e inoculou-se 250 µL dessa suspensão ($\sim 8,0 \times 10^8$ cél/mL) em placas de Petri contendo os meios de cultivos nas diferentes composições testadas. Espalhou-se o inóculo com o auxílio da alça em L e as amostras foram incubadas a TA e a 37° C. Observou-se a morfologia macro e microscópica nos tempos 5, 10 e 15 dias de crescimento.

4.8.4 Ensaio de crescimento em meio mínimo ágar S (meio mínimo sintético) e SD (sintético adicionado de D-glucose)

Meio de cultura mínimo S sólido: 6.7 g *yeast nitrogen base* (sem aminoácidos) + 20 g de Ágar bacteriológico. Meio de cultura mínimo SD sólido: - ao meio mínimo S, adicionou-se D-glucose para uma concentração final de 1.5%. Nesse ensaio utilizaram-se os mesmos procedimentos de semeadura e de incubação descritos acima. Após semeadura observou-se o crescimento e, principalmente, a ocorrência ou não de alterações morfológicas nas colônias do fungo cultivadas á TA e a 37°C.

4.9 Análise do transcrito e dos genes diferencialmente expressos do isolado YRT

O sequenciamento do transcrito do isolado Pb339 e do isolado YRT de *P. brasiliensis* pelo método high-throughput RNA-Seq, sob diferentes condições de temperatura e tempo de cultivo. Visando sua análise e dos genes diferencialmente expressos do isolado YRT, realizou-se a etapa de extração do RNA total e o controle de qualidade do material obtido.

A análise computacional foi realizada no Broad Institute of MIT and Harvard (Cambridge, MA – EUA), sob a supervisão da Dra. Christina Cuomo, líder do grupo de Genômica de Fungos. Parte do processamento de dados também foram realizadas no Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz Minas, junto ao grupo Informática de Biosistemas e Genômica do liderado pelo Dr Jeronimo Ruiz.

4.10 Extração do RNA total e controle de qualidade

Para a extração do RNA, avaliaram-se as metodologias empregadas em análises de transcrito de *P. brasiliensis* previamente descritos na literatura considerando-se, entre outros aspectos, tempo de cultivo e temperaturas de incubação (Felipe *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2005; Felipe, Andrade, *et al.*, 2005; Da Silva Neto *et al.*, 2014).

Todo o material plástico utilizado estava livre de DNase e RNase e esterilizado. A vidraria foi rigorosamente lavada com detergente extran 2%, enxaguada em água destilada (autoclavada por 45 min) e incubada *overnight* em água DEPC 0,1% (*diethylpirocarbonate*, Acumédia®) para inativação de RNases. Para a inativação da solução DEPC autoclavou-se a solução e todo o material tratado por 15 min.

As amostras Pb339 e YRT foram cultivadas a 37°C e a TA por 3 subcultivos sucessivos, para a indução de crescimento exponencial, e propagadas em Ágar YPD (1,5%). As condições experimentais para a extração do RNA para cada amostra estão apresentadas na (Tabela 5).

Tabela 5. Condições experimentais para a extração de RNA total

Amostra	Temperatura (°C)	Tempo de crescimento (dias)	Morfologia
PbB339	37	5	L
PbB339	TA	15	M
YRT	37	5	L
YRT	TA	5	L
YRT	TA	15	L

TA = temperatura ambiente
L = Levedura
M = Micélio

A extração do RNA total de cada amostra foi realizada em triplicata biológica com o auxílio do *kit* comercial *RNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN®) e procedendo-se ao ensaio de acordo com o recomendado pelo fabricante. A qualidade da extração foi avaliada previamente em gel Agarose 1.8% acrescido de 0.1% de hipoclorito (NaClO) (Aranda *et al.*, 2012) e, posteriormente, analisadas quanto à integridade e quantificadas em eletroforese por capilaridade na plataforma Agilent Bioanalyzer 2100. A métrica para a medir a integridade do RNA foi o valor de RIN (*RNA Integrity Number*) que se baseia numa escala numérica que varia 1 a 10, onde 1 indica amostras cuja integridade foi completamente comprometida e 10 indica amostras de RNA íntegros (ou não degradados) (Schroeder *et al.*, 2006).

4.11 Sequenciamento em larga escala (RNASeq) do transcrito do isolado Pb339 e de sua isolado atípico YRT de *P. brasiliensis*

As etapas de preparação das bibliotecas e do sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Multi Usuários Centralizado (<http://genfis40.esalq.usp.br/multi/>) da Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz - ESALQ, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP, sob a coordenação do Professor Dr. Luiz Lehmann Coutinho.

O *kit* TruSeq™ *stranded mRNA Library prep* (Illumina) foi utilizado para preparar as bibliotecas *pared-end* (2 x 100 PE) de sequenciamento seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_truseq/truseqstran

dedmrna/truseq-stranded-mrna-sample-prep-ls-euc-ltf-15031058-e.pdf). Resumidamente, as amostras de RNA total foram submetidas ao processo de depleção de RNA ribossomal (rRNA) e enriquecimento de mRNA. O mRNA resultante foi fragmentado, purificado e o cDNA sintetizado juntamente com os adaptadores do sequenciamento. As bibliotecas foram quantificadas previamente em fluorômetro Qubit 2.0 (Invitrogen) e em seguida realizou-se a quantificação por PCR quantitativa (qPCR) usando o termociclador StepOne (*Applied Biosystems*) seguindo a metodologia estabelecida no guia *Sequencing Library qPCR Quantification Guide* (Illumina™). Após a quantificação as 5 amostras em triplicatas biológicas foram sequenciadas, em um único canal (*lane*) da *flow cell*, pelo equipamento HiSeq2500 Illumina.

4.12 Controle de qualidade do sequenciamento

As leituras PE (*Paired-end* – 2 x 100) geradas pelo sequenciador foram disponibilizadas no formato FastQ. Resumidamente, são dois arquivos em paralelo, sendo um contendo uma leitura de 100 pb da “ponta” esquerda (R1, *forward* ou *left*) do fragmento sequenciado e outra leitura de 100 pb da “ponta” direita (R2, *reverse* ou *right*) desse mesmo fragmento. Uma descrição pormenorizada desses arquivos pode se vista no Apêndice II desse documento.

A qualidade das leituras de sequências (dados brutos) foi avaliada previamente pelo *software* PrinSeq v0.15 (Schmieder e Edwards, 2011). Utilizou-se o *software* Trimmomatic v0.35 (Bolger *et al.*, 2014) para a retirada das sequências dos adaptadores e das bases da cauda poli-A do conjunto de dados do sequenciamento. Para o corte de qualidade optou-se pelo aplicativo PrinSeq v0.15 por ser uma ferramenta que gera um resumo das estatísticas do sequenciamento e gráficos que facilitam a análise visual. As leituras remanescentes com o valor médio de qualidade Phred ≥ 25 e com comprimento final ≥ 90 pb foram mantidas. Os parâmetros e linhas de comando utilizadas estão descritos no Apêndice III e Apêndice IV).

4.13 Montagens do transcrito do isolado Pb339 e do isolado atípico YRT

A estratégia de montagem (*assembly*) por referência foi utilizada. O genoma de *P. brasiliensis* Pb18.v2 (Muñoz *et al.*, 2014) disponível na base de dados do Broad Institute

(www.broadinstitute.org) foi utilizado para essa análise. Utilizaram-se as sequências dos genes do genoma de *P. brasiliensis* Pb18.v2, considerando 100 pb a mais, que os limites do gene, flanqueando cada extremidade da sequência. O algoritmo Bowtie2 versão 2.2.6 (Langmead e Salzberg, 2012), foi utilizado para alinhar as leituras do sequenciamento contra os genes do genoma (Painel IV). A estimativa da abundância dos transcritos foi calculada pelo software RSEM (Li e Dewey, 2011) que normaliza dos níveis de expressão levando em conta o comprimento do transcrito, o número de leituras mapeadas para o transcrito e o número total de leituras mapeadas gerando uma matriz normalizada com a métrica de expressão FPKM (*fragments per kilobase transcript length per million fragments mapped*) ou TPM (*transcripts per million transcripts*). Nesse trabalho, utilizou-se a métrica FPKM e utilizou-se a representação gráfica de *heat map* para inspecionar a homogeneidade entre as réplicas biológicas e o perfil geral de expressão entre cada amostra. Para tal, os valores de FPKM foram agrupados por k-means, que consiste, de uma forma genérica, em um método de partição de um conjunto de elementos n (observações) em k grupos predeterminados. O agrupamento é iniciado com a escolha aleatória de sementes (centróides) e a distância Euclidiana é calculada entre cada elemento n em relação aos centróides, incluindo cada n ao grupo que possuir a menor distância (mais similar) entre n e o centróide. As iterações são repetidas até que todos os elementos façam parte de um dos grupos. Em seguida, procura-se encontrar uma partição melhor, do que a gerada arbitrariamente, calculando-se o grau de homogeneidade entre os elementos de cada grupo, pela soma dos quadrados residual (SQRes), sendo esta, uma medida usada para avaliar a efetividade da partição. Os parâmetros e comandos utilizados nessa etapa podem ser verificados no Apêndice V.

4.13.1 Análises de reprodutibilidade dos dados

Uma análise crucial é a avaliação da reprodutibilidade do sequenciamento. Nesse aspecto avaliou-se a correlação entre as réplicas biológicas, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson (CCP) ($R^2 > 0,9$) (Adiconis *et al.*, 2013). A análise do componente principal (PCA) foi utilizada para explorar a relação entre as réplicas com o objetivo de identificar *outliers*, artefatos biológicos gerados por PCR (técnica utilizada na amplificação das bibliotecas de fragmentos) e transcrição reversa do mRNA (*batch effect*) e os efeitos de linha (*lane* - gerados pela *flowcell*) muito confundidos com diferenças de expressão entre as amostras.

4.13.2 Análises da expressão diferencial entre os genes do isolado Pb339 e do isolado atípico YRT de *P. brasiliensis*

O conjunto de dados provenientes do RNA-Seq tem como características principais: a) dados de contagem; b) pequeno número de repetições; c) grande variedade de transcritos; d) bibliotecas de tamanhos diferentes e; e) presença de superdispersão, ou seja, a variância é maior que a média (Robinson e Smyth, 2007). O modelo estatístico de distribuição binomial negativa (BN) foi a abordagem escolhida para calcular as diferenças de expressão entre as amostras. Esse modelo assume que a variância é maior que a média, permitindo um tratamento “natural” para o perfil de superdispersão. As análises de diferenças de expressão (Painel VI) foram realizadas com o pacote EdgeR (versão R 3.1.0) disponível em <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>, por considerar o modelo de distribuição BN para o cálculo dos níveis de expressão gênica (Robinson *et al.*, 2010).

Após esse passo, extraiu-se da matriz normalizada valores de FPKM < 5 para as análises relativas dos genes *up-* e *down regulated* (mais e menos expressos) de cada amostra comparada. Considerou-se um corte para a taxa de FDR (*false discovery rate* - taxa de falso positivo) $p\text{-valor} < 0,001$ ($-p$) e o valor de $\log_2\text{-fold-change}$ ($-C$) ≥ 2 significando 2^2 ou 4 vezes (Painel VII) (Li *et al.*, 2012).

4.14 Integração de dados “ômicos”

4.14.1 Anotação funcional e análises de enriquecimento de função

A anotação funcional do transcrito foi realizada pela integração dos dados da anotação do genoma de *P. brasiliensis*, Pb18.v2 (S1), mantida pelo Broad Institute, que mantém a política de utilização de bancos de dados biológicos de alta curadoria, (sequências manualmente anotadas, revisadas ou até mesmo com validações experimentais) como é o caso da base de dados SwissProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>), Pfam (Finn *et al.*, 2016) e GeneOntology (<http://geneontology.org/>). Apesar da alta qualidade de dados, essas bases são limitadas em número de sequências e dessa forma, grande parte da anotação funcional desse genoma, refere-se a proteínas hipotéticas.

Diante desse desafio, optou-se por reanotar, paralelamente, não apenas o genoma do Pb18.v2, mas também os outros dois genomas disponíveis, Pb01.v2 e Pb03.v2, disponíveis em (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiDownloads.html) para as análises comparativas. Os dados referentes aos três genomas do complexo *Paracoccidioides* (versão 1 e 2) foram obtidos do Broad Institute of Harvard and MIT (<http://www.broadinstitute.org/>). O isolado Pb 01 corresponde ao genoma da espécie *P. lutzii* e os isolados Pb03 e Pb18 correspondem ao genoma da espécie *P. brasiliensis*. A Tabela 6 a seguir, mostra as características gerais das duas versões desses genomas.

Tabela 6. Resumo estatístico das montagens e dos genes das espécies do complexo *Paracoccidioides*

Métrica	Pb18.v1	Pb18.v2	Pb03.v1	Pb03.v2	Pb01.v1	Pb01.v2
Assembly Size	29.95	29.95	29.06	29.06	32.94	32.93
Total contig length (Mb)	29.4	29.47	28.79	28.84	32.55	32.63
Scaffolds	57	57	65	65	111	110
Scaffold N50 (Mb)	2.15	2.15	1.88	1.88	1.03	1.03
Contigs	669	556	552	496	885	672
Contig N50 (kb)	109.68	123.84	114.92	119.9	84.28	113.45
Genes	8741	8390	7875	8427	9132	8826
Exons	33239	25785	27450	25457	37311	26877
Mean Intergenic Distance	1628.43	1932.12	1849.21	1830.53	1799.26	2123.85
% Genome Coding	39.28	38.97	38.84	39.94	36.86	36.12
GC Scaffolds (%)	44.36	44.35	44.5	44.49	42.82	42.82
GC Genes (%)	48.48	49.28	48.86	49.28	48.05	48.93
GC Intergenic (%)	39.63	40.11	40.12	40.28	37.44	38.27
GC Exons (%)	50.07	50.6	50.35	50.63	49.77	50.36
GC Intron (%)	42.27	41.34	42.44	41.02	41.71	40.59

*Tabela obtida e adaptada de Muñoz, 2014 (Muñoz *et al.*, 2014).

A base de dados NR (não redundante) de proteínas foi recuperada via protocolo ftp direto da página do NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/>) e armazenados localmente. Uma sequência de *scripts* em linguagem de programação *perl* foram desenvolvidos para o parseamento dos arquivos de entrada e saída (*input* e *output*), integração e análise dos dados. A reanotação funcional consistiu, resumidamente, na busca por similaridade de sequências via algoritmo BLAST (*Basic local alignment search tool*) (Altschul *et al.*, 1990) comparando o proteoma predito dos genomas contra o NR. O *software* InterProScan foi utilizado para anotar assinaturas de proteínas (Quevillon *et al.*, 2005) e identificou-se regiões repetitivas nos genomas com a ferramenta Tandem Repeat Finder (TRF) (Benson, 1999).

4.15 Investigação de alelos variantes

O algoritmo GATK (<https://www.broadinstitute.org/gatk/>) foi utilizado para detectar potenciais variantes nas leituras sequenciadas. Para tal, utilizou-se o genoma de referência Pb18 para as análises. Avaliaram-se regiões gênicas e URT (*untranslated region*), pesquisando por variantes sinônimos e não sinônimos e *indels* (inserções e deleções). O output do programa é um arquivo texto VCF.

5 RESULTADOS

I - Caracterização geral do isolado atípico YRT de *P. brasiliensis*

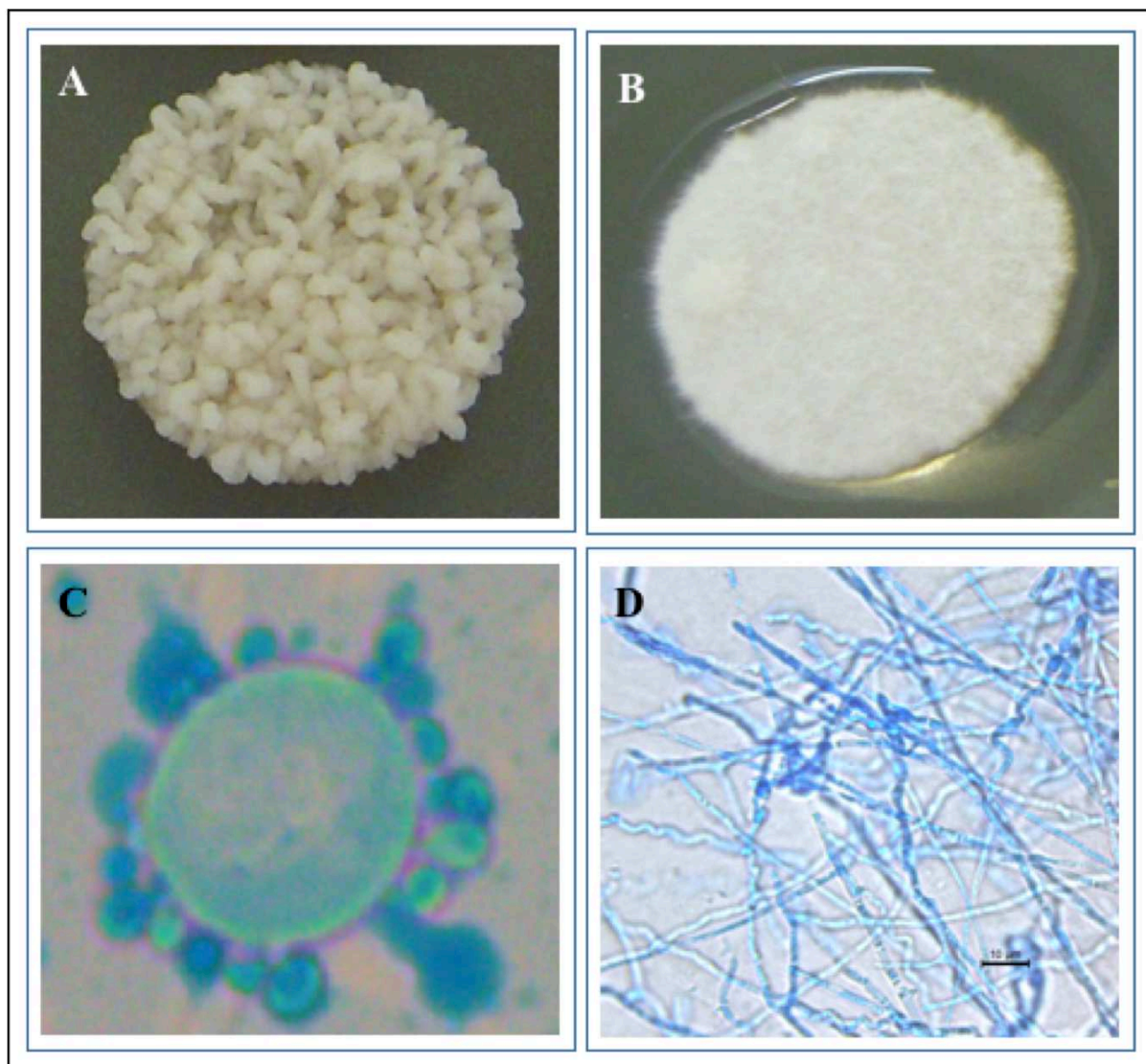
5.1 Aspectos morfológicos do isolado Pb339 de *P. brasiliensis*

O isolado clínico Pb339 (ATCC 32069) é parte da coleção do laboratório de Biologia de Microrganismos sendo mantido a 37° C com subcultivos semanais e a TA com subcultivos bimestrais (Figura 6). Macroscopicamente, quando incubado a 37°C esse isolado apresenta-se como colônias de aspecto cerebriforme, não aderentes ao Ágar, de consistência cremosa e de cor bege clara (Figura 6A), com tempo de crescimento entre 5-7 dias. Ao exame microscópico, as células leveduriformes (L) são globosas ou ovoides (Figura 6C), de parede celular espessa, e.g. dupla, bi-refringente; há presença de inclusões citoplasmáticas; as leveduras apresentam brotamentos únicos ou múltiplos, sendo que os brotamentos múltiplos podem tomar o aspecto de "roda de leme" e são considerados achados patognomônicos no diagnóstico etiológico da micose causada pelo fungo (Lacaz, 1994).

As colônias de micélio (M) ou filamentoso (Figura 6B) possuem aspecto cotonoso, com colônias pequenas e irregulares, de cor branca coberta por curto micélio aéreo que se adere firmemente ao Ágar. As hifas são observadas à TA e seu crescimento é considerado lento, em torno de 21 dias para atingir a fase estacionária. Sob a microscopia óptica observam-se hifas delgadas e septadas (Figura 6D), podendo estar presentes, ou não, artrósporos e clamidoconídeos intercalares, laterais ou terminais (Negroni, 1968; Lacaz, 1994).

Figura 6. Características macro e microscópicas do isolado *P. brasiliensis* Pb339.

Todas as amostras foram cultivadas em Ágar YPD. Em **A** – Morfologia macroscópica da colônia L a 37°C com 7 dias de crescimento. Observe o aspecto cerebriforme da colônia. Em **B** – Morfologia macroscópica da colônia M a TA com 15 dias de crescimento. Observe o aspecto filamentososo da colônia. Em **C** – Notem-se os múltiplos brotamentos a partir da célula mãe conferindo a estrutura de roda de leme. Microscopia ótica da célula de L a 37°C com 5 dias de crescimento, aumento 1000 X em óleo de imersão; **D** – Microscopia ótica do M



incubado a TA com 15 dias de crescimento, aumento de 400 X. Note-se a morfologia de hifas septadas.

5.2 Seleção do isolado atípico YRT (*Yeast at Room Temperature*)

A seleção do isolado que apresenta alteração no dimorfismo térmico iniciou-se com a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de sulfametoxazol para o isolado parental, isolado Pb339 (ATCC 32069), de modo a definir a concentração da droga a ser incorporada ao Ágar YPD. Os resultados apresentados na Tabela 7, mostram que tanto a CIM50 e a CIM90 de cultivos à temperatura ambiente, após 15 dias, foram, respectivamente, 300 e 400 µg/mL, superiores às observadas a 37°C, as quais corresponderam a 18,5 e 75 µg/mL, apresentando, nessa condição, leituras estáveis desde o 7º dia de cultivo. É interessante destacar que as culturas mantidas a 37°C não apresentaram crescimento a partir do segundo repique. Pode-se interpretar que os cultivos à TA apresentaram maior tolerância ao antifúngico do que a 37°C. Concentrações superiores a 400µg/mL de sulfametoxazol foram testadas (500µg/mL, 600µg/mL, 700µg/mL, 800µg/mL, 900µg/mL, 1000µg/mL), a TA, porém, o crescimento celular foi se reduzindo progressivamente até a ausência de crescimento, geralmente a partir do terceiro subcultivo.

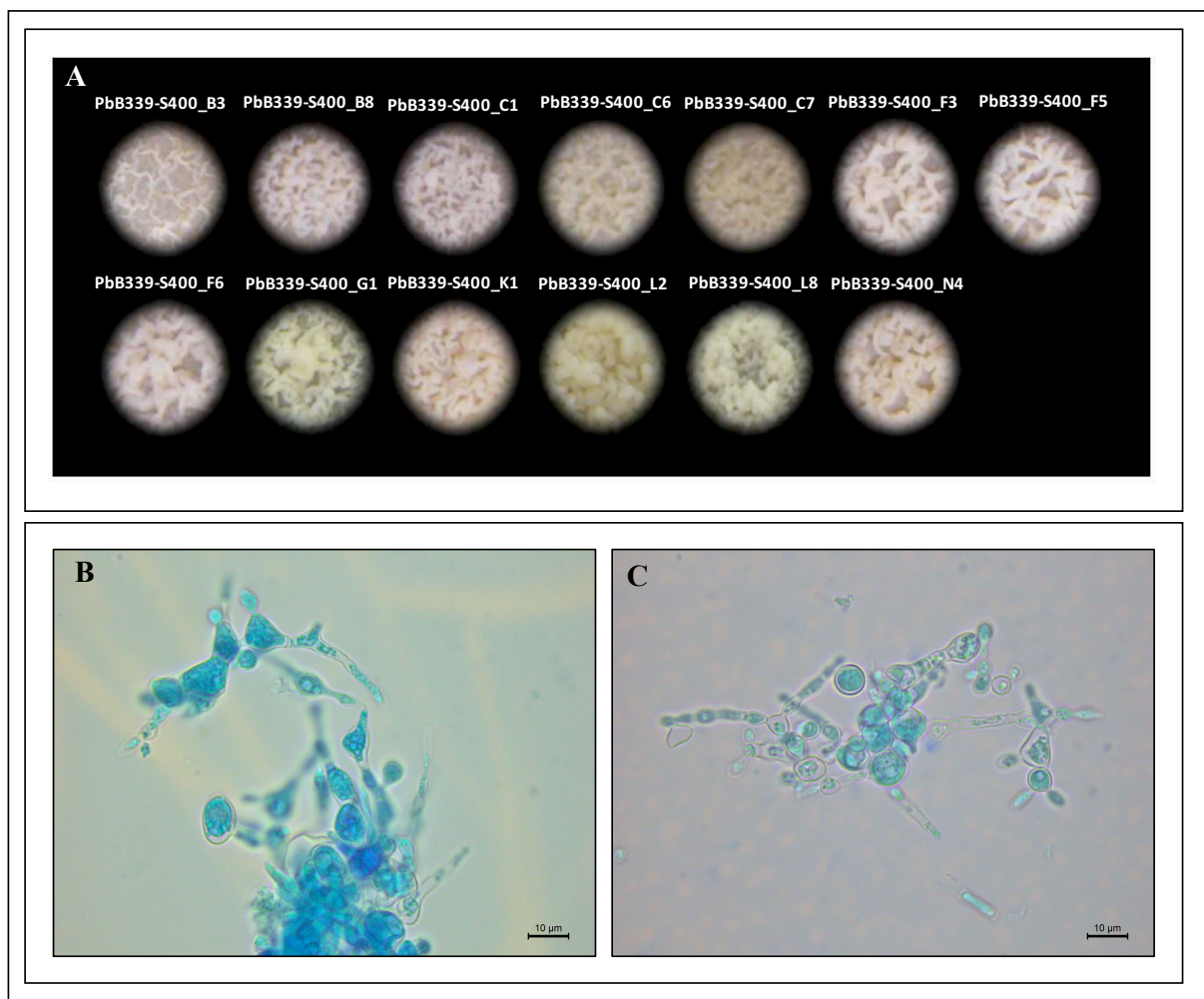
O aspecto morfológico da colônia do isolado Pb339 cultivadas em YPD, na presença de sulfametoxazol a TA apresentou-se com a mesma morfologia típica das colônias L, sem aderência ao Ágar, de cor bege e de aspecto cerebriforme (Figura 7A). Ao microscópio ótico, a ausência de hifas nessas culturas foi confirmada, as células apresentaram-se grumadas com morfologia irregular variando entre as formas arredondadas, ovais, alongadas, catenuladas ou em correntes, com poucos brotamentos (de 1 a 3), formando estruturas sugestivas de pseudo-hifas; presença comum no citoplasma de estruturas vesiculares lipídicas de tamanhos variados (Figura 7B e 7C). Esse ensaio resultou em 13 amostras selecionadas ao longo do processo seletivo (aproximadamente 1 ano) com morfologia atípica, leveduriformes à TA cultivando-se em Ágar YPD com sulfametoxazol (Figura 7A).

Tabela 7. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM50 e CIM90) de sulfametoxazol ($\mu\text{g/mL}$) para o isolado Pb339 (ATCC 32069) de *P. brasiliensis* em Ágar YPD.

Amostras	Meio (temp.)	Tempo de incubação	Sulfametoxazol	
			50%	90%
PbB339	YPD (T.A.)	7	150	300
		10	300	400
		15	300	400
PbB339	YPD (37oC)	7	18.75	75
		10	18.75	75
		15	18.75	75

Figura 7. Documentação fotográfica da morfologia colonial de 13 amostras selecionadas a partir do isolado Pb339 de *P. brasiliensis*.

Note-se que as 13 amostras apresentaram morfologia atípica, cerebriformes à TA, em Ágar YPD, na presença de 400µg/mL de sulfametoxazol, sugestivo de morfologia leveduriforme quando observados à microscopia. Em **A** – as siglas adotadas na identificação das amostras selecionadas indicam a identidade do isolado parental (Pb339) e a concentração de sulfametoxazol em que foram cultivados (-S400, 400 µg de sulfametoxazol), além da identidade da placa e da colônia (letra e número, respectivamente, p. ex.: B3, B8, C1, C6, C7 etc.). Em **B** e **C** células do isolado Pb339 cultivadas na presença de sulfametoxazol, observação sob microscopia ótica, 5 dias de crescimento a TA com aumento de 1000 X.



5.3 Estabilidade fenotípica das culturas YRT na ausência de sulfametoxazol

5.3.1 Ensaio em Ágar YPD a TA e 37°C

As 13 amostras foram subcultivadas semanalmente durante 10 repiques sucessivos, na ausência de sulfametoxazol, à TA. Nessas condições, 23% dos cultivos (Figura 7, amostras: Pb339-S400_F3, Pb339-S400_F5 e Pb339-S400_K1) permaneceram leveduriforme, com crescimento em torno de 5 dias, características estas semelhantes às do isolado Pb339 parental quando cultivado a 37°C.

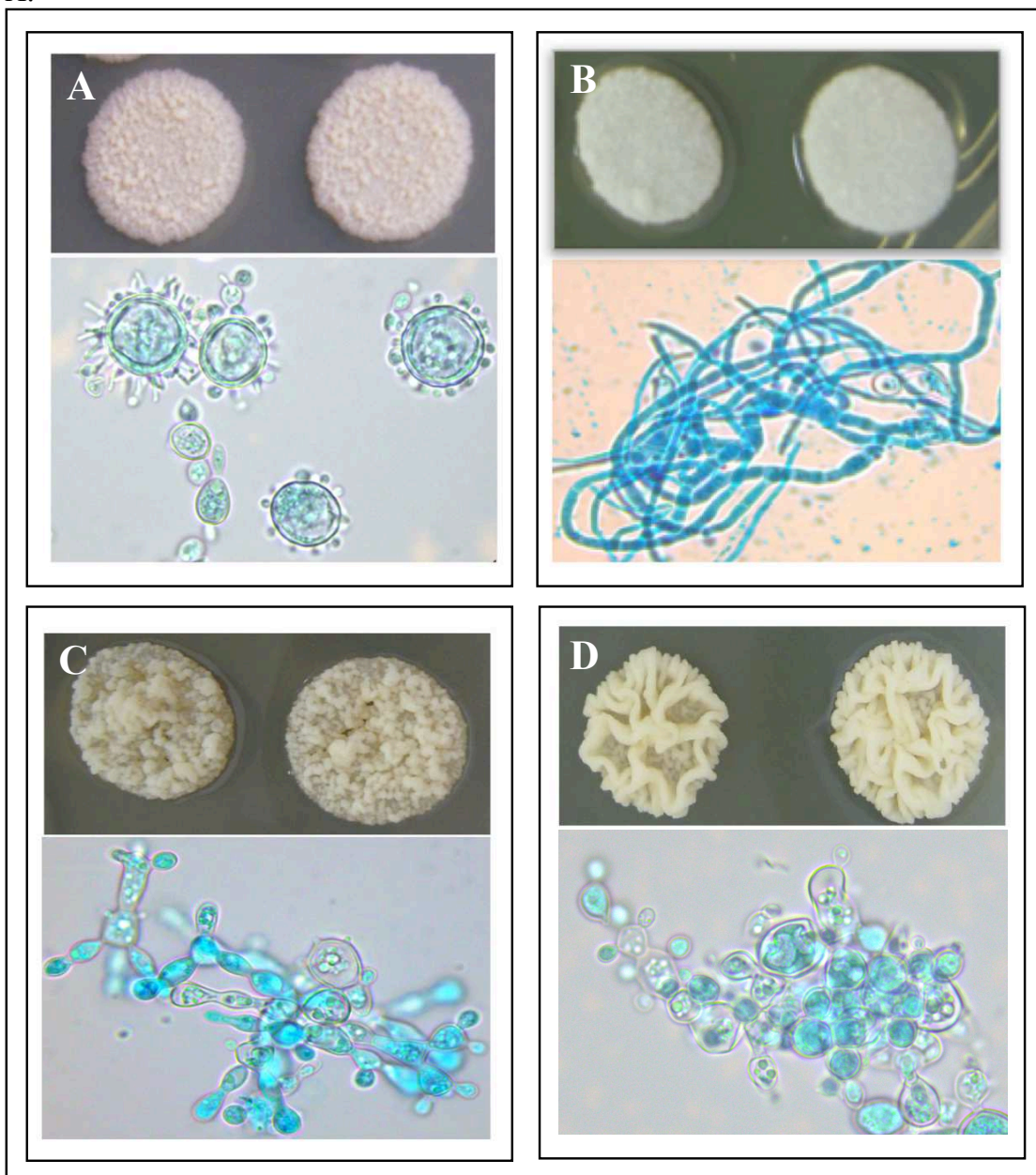
Essas 3 amostras foram, então, cultivadas a 37°C, por 10 repiques sucessivos a cada 7 dias, de modo a permitir a observação dos padrões morfológicos e de crescimento na condição de estresse térmico. Inicialmente, as culturas apresentaram um longo período de crescimento, aproximadamente 15 dias, quando comparadas ao isolado controle Pb339, mas o aspecto leveduriforme foi mantido. Ao longo do ensaio observou-se a diminuição desse tempo de crescimento para 5 dias. Por outro lado, ao contrário do padrão apresentado na fase leveduriforme do isolado controle parental Pb339, a 37°C, as 3 amostras atípicas apresentaram colônias com forte aderência ao meio de cultura, sendo essa normalmente uma característica das hifas de *P. brasiliensis* na sua fase filamentosa. Finalmente as culturas foram novamente incubadas a TA e mantidas sob as mesmas condições de manutenção citadas anteriormente. As amostras Pb339-S400_F3 e Pb339-S400_K1 recuperaram progressivamente a capacidade de conversão para micélio e a amostra Pb339-S400_F5, a partir de agora denominada YRT (*Yeast at Room Temperature*), foi a única que não se diferenciou, mantendo inalterado seu fenótipo defectivo para o dimorfismo térmico.

A Figura 8 apresenta alguns registros de observações macro e microscópicas de cultivos do isolado controle parental Pb339 e do isolado YRT (*Yeast at Room Temperature*), sob as condições de incubação a 37° C (Figura 8A e Figura 8C) e à TA (Figura 8B e Figura 8D). Observou-se que a isolado YRT, em cultivos em meio YPD sólido, independente da temperatura, tanto à TA ou a 37° C (Figuras 9C e 9D) permaneceram com aspecto leveduriforme. Um achado interessante foi a observação de que as culturas do isolado YRT a 37° C, apresentam uma característica de serem fortemente aderidas ao Ágar, apresentando aspectos grumosos secos, superfícies rugosas e de cor bege clara. As colônias à TA (Figura 8D), são cerebriformes e cremosas, facilmente removidas do Ágar, apresentando aspectos

mais similares ao das colônias de leveduras do isolado Pb339 quando cultivadas a 37°C. Comparativamente, as células das leveduras mostradas nas Figura 8C e Figura 8D oriundas do isolado atípico YRT, possuem morfologia irregular apresentando formas catenuladas ou em correntes, globosas ou ovóides, às vezes com aspecto sugestivo de pseudo-hifas. É interessante registrar que foi possível observar a existência de células com dois ou três brotamentos na isolado YRT, similares às descritas na literatura como “*Mickey mouse*”, contudo, não se observaram regularmente campos contendo células com numerosos ou múltiplos brotamentos como as rodas de leme típicas (Figura 8A).

Figura 8. Documentação fotográfica da morfologia colonial e por microscopia ótica do isolado Pb339 e do isolado atípico YRT.

Todas as amostras foram cultivadas em Ágar YPD. Em A – Morfologia colonial, aspecto cerebriforme, de cultivo do isolado controle parental Pb339, à temperatura de 37°C, por 5 dias; e, logo abaixo, o aspecto leveduriforme à microscopia ótica, com multibrotamentos característicos em rodas de leme. Em B - Morfologia colonial, aspecto filamentososo, de cultivo do isolado controle parental Pb339, à TA, por 15 dias; e, logo abaixo, o aspecto do micélio à microscopia ótica, com hifas delgadas septadas. Em C - Morfologia colonial, aspecto cerebriforme, de cultivo do isolado YRT, a 37°C, por 5 dias; e, logo abaixo, o aspecto leveduriforme à microscopia ótica, com células catenuladas e ramificadas. Em D - Morfologia colonial, aspecto cerebriforme com dobras acentuadas, de cultivo do isolado YRT, incubadas à TA, por 15 dias; logo abaixo, aspecto leveduriforme à microscopia ótica, com células esféricas e ovóides com alguns brotamentos. Microscopia ótica em aumentos de 1000 X.



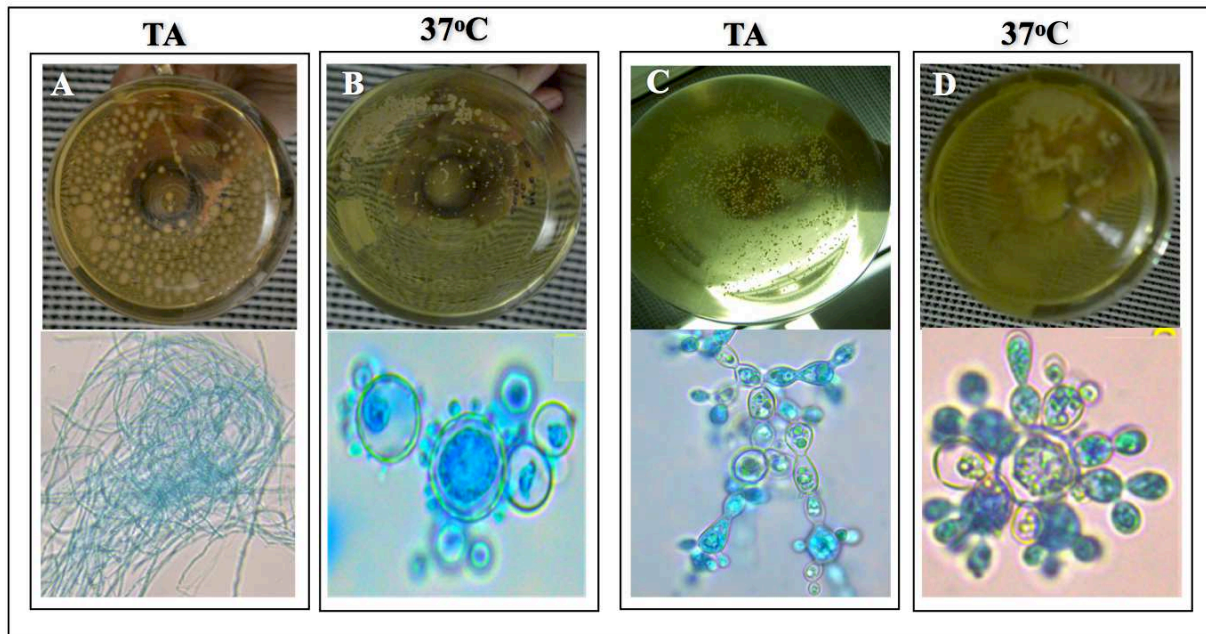
5.3.2 Estabilidade do fenótipo atípico YRT em cultivos em caldo YPD à TA e a 37°C

Foram realizados ensaios em meio líquido para verificar se ocorreria indução da transição de fases do isolado YRT. Essa isolado foi cultivada em caldo YPD, sob agitação a 120 rpm a T.A e a 37°C. Os subcultivos foram realizados a cada 7 dias observando-se e registrando-se a morfologia macro e microscópicas e comparando-se à dos cultivos controle parental Pb339 (Figura 9). Nestes, os cultivos de M (Figura 9A) apresentam hifas dispersas no sobrenadante e tufo agregados, com filamentos bem nítidos, num aspecto que pode ser descrito como bolas esféricas de fios (semelhantes à pompons), de tamanhos variados e de cor branca. A 37°C o isolado Pb339 (Figura 9B) apresentou-se como levedura típicas, com brotamentos múltiplos, a massa colonial forma pequenos agregados de cor bege que se dispersam facilmente gerando turvação do sobrenadante com a agitação do meio.

As Figuras 9C e 9D mostram as culturas YRT cultivadas a 37°C e a TA respectivamente. As culturas constituem-se de pequenos grumos de células fortemente agregados, de formas irregulares e de tamanhos variados semelhantes aos da parental Pb339 L a 37°C, contudo não se dispersam facilmente, pelo contrário, apresentam pouca dispersão e apresenta baixa turvação (Figura 9C e Figura 9D) e maior e mais rápida sedimentação após serem suspensos por agitação dos frascos. As massas coloniais formaram agregados maiores e mais densos. À microscopia ótica tem-se a impressão de que as células permanecem ligadas após o processo de brotamento ou divisão, sem desprendimento de brotos jovens que sucessivamente voltam a brotar mantendo-se ainda unidos como células ovóides catenuladas, inclusive com formas radiais.

Figura 9. Documentação fotográfica das características macro e microscópicas do isolado Pb339 de *P.brasiiliensis* e da sua isolado YRT com 7 dias de crescimento em caldo YPD.

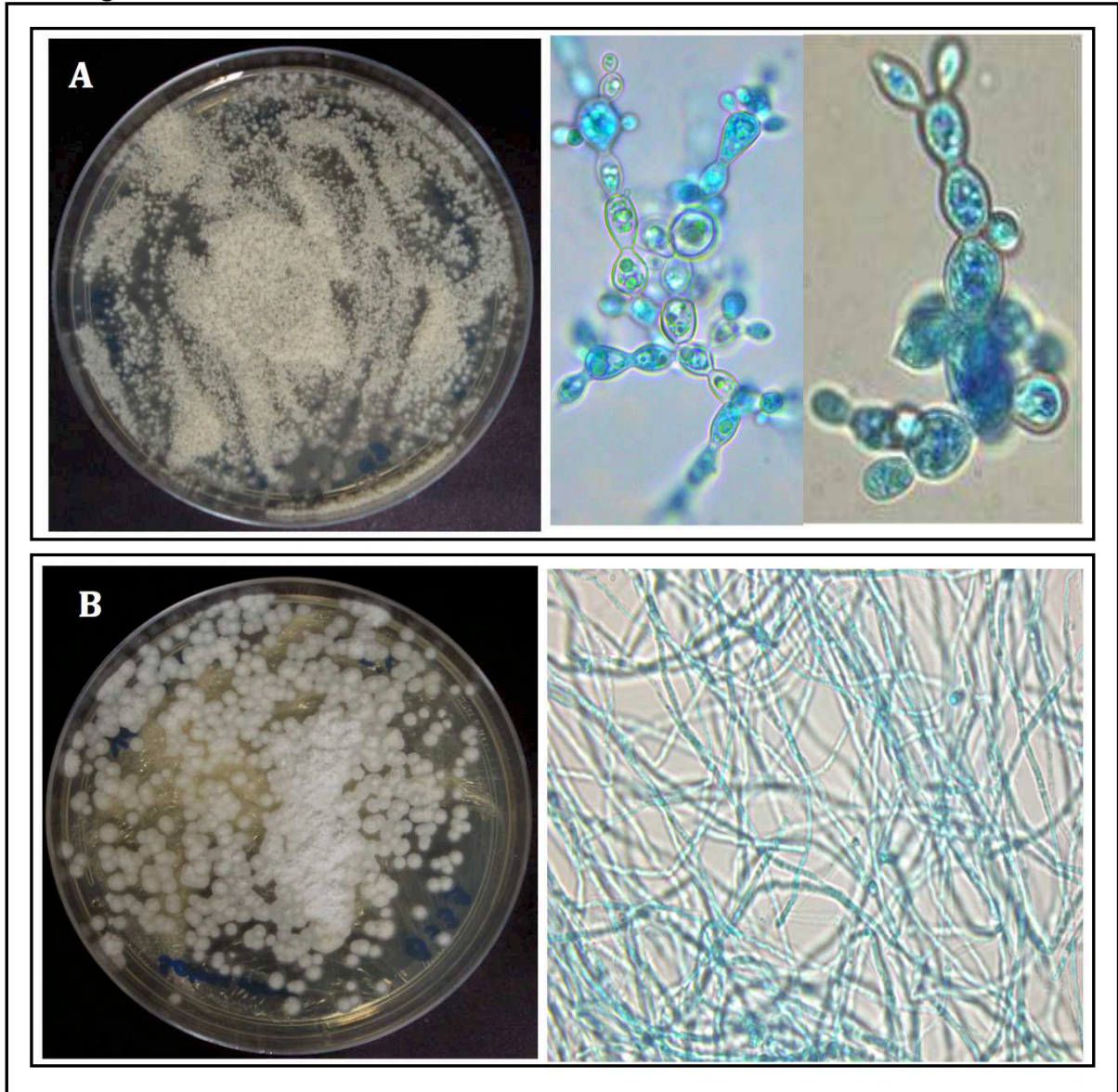
Em **A** – Pb339 M a TA, aumento de 400X; Em **B** Pb339 L a 37°C; Em **C** - YRT (*Yeast-like*) a 37°C ; Em **D** - YRT a TA (*Yeast-like*) a TA. Aumento de 400 X e 1000X.



Um achado interessante foi a observação da presença de pequenos filamentos nos sobrenadantes dos cultivos YRT, sugerindo a presença de pequenos segmentos de hifas. Essa presença nos cultivos em caldo foi particularmente intrigante considerando que esses cultivos formaram fortes agregados, com escassez ou ausência de formas esféricas e ovoides livres nesses sobrenadantes, tanto à T.A e particularmente a 37°C. Para verificar se esse achado indicava uma tendência de reversão para a fase micelial ou se o fenótipo YRT permaneceria estável, sobrenadantes desses cultivos ricos em filamentos foram replaqueados em meio sólido, para observação dos morfotipos coloniais e de seu aspecto micromorfológico. Após cultivos à temperatura ambiente por 7 dias dos sobrenadantes da cultura líquida YRT (250 µL/placa Ágar YPD) e do isolado controle parental Pb339 observou-se, em colônias oriundas de pequenos filamentos, a manutenção da morfologia colonial cerebriforme (Figura 10) e morfologia celular com formas leveduriformes ovoides e catenuladas (Figura 10A), constatando-se a estabilidade do fenótipo YRT. Já as leveduras do isolado Pb339 converteram-se em micélio à TA apresentando filamentação ampla (Figura 10B).

Figura 10. Documentação fotográfica dos morfotipos coloniais e de seu aspecto micromorfológico obtidos após plaqueamento de sobrenadantes ricos em filamentos oriundos de cultivos YRT em caldo.

Em A – à esquerda, placa com cultivo de aspecto cerebriforme do isolado YRT à TA; à direita, morfologia leveduriforme catenulada do isolado YRT à TA (aumento 1000x); Em B – à esquerda, placa com cultivo de aspecto filamentososo do isolado Pb339 à TA; à direita, morfologia micelial, hifas do isolado Pb339 à TA. Aumento de 400 X.

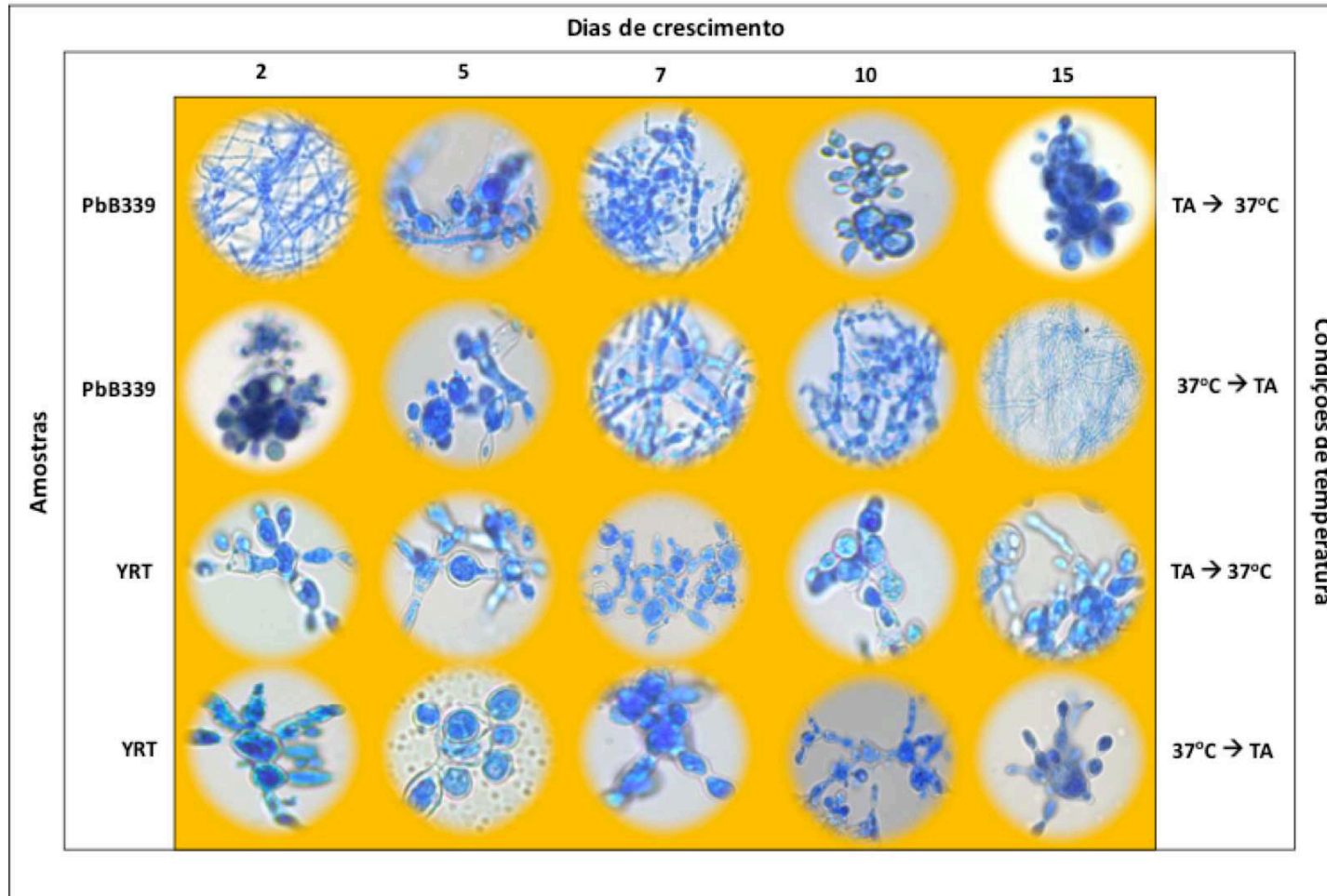


5.3.3 Acompanhamento dos estágios de transição induzidas por temperatura dos isolados Pb339 e YRT

Os estágios de transição do isolado parental Pb339 e do seu isolado YRT de *P. brasiliensis* foram acompanhados por microscopia ótica, diariamente, durante 15 dias. A Figura 11 resume o ensaio nos dias 2, 5, 7, 10 e 15 onde foi possível observar maiores diferenças entre as células parentais e o isolado YRT a partir da mudança de temperaturas. Nesse ensaio os cultivos em Ágar YPD 37°C foram submetidos à TA e os cultivos à TA foram expostos a 37°C durante 15 dias. O isolado Pb339 apresentou conversão completa de M→L sob a condição TA→37°C e de L→M sob a condição 37°C →TA, confirmando a capacidade desse isolado em expressar reversivelmente a transição a partir alterações de temperatura. Já o isolado YRT durante os 15 dias de cultivo, independente da temperatura, manteve-se como L sem apresentar diferenciação morfológica para micélio (Figura 11).

Figura 11. Documentação fotográfica representativa de observações em microscopia ótica de estágios da transição de fases M e L associadas ao dimorfismo térmico do isolado Pb339 de *P. brasiliensis* e do isolado atípico YRT.

Os números da barra horizontal representam o tempo de cultivo em dias e as letras na barra vertical representam a identificação das amostras e suas respectivas fases de conversão: A – Pb339 TA → 37°C; B - Pb339 37°C → TA; C – YRT 37°C → TA, D – YRT TA → 37°C. Aumentos de 400 X e 1000 X.



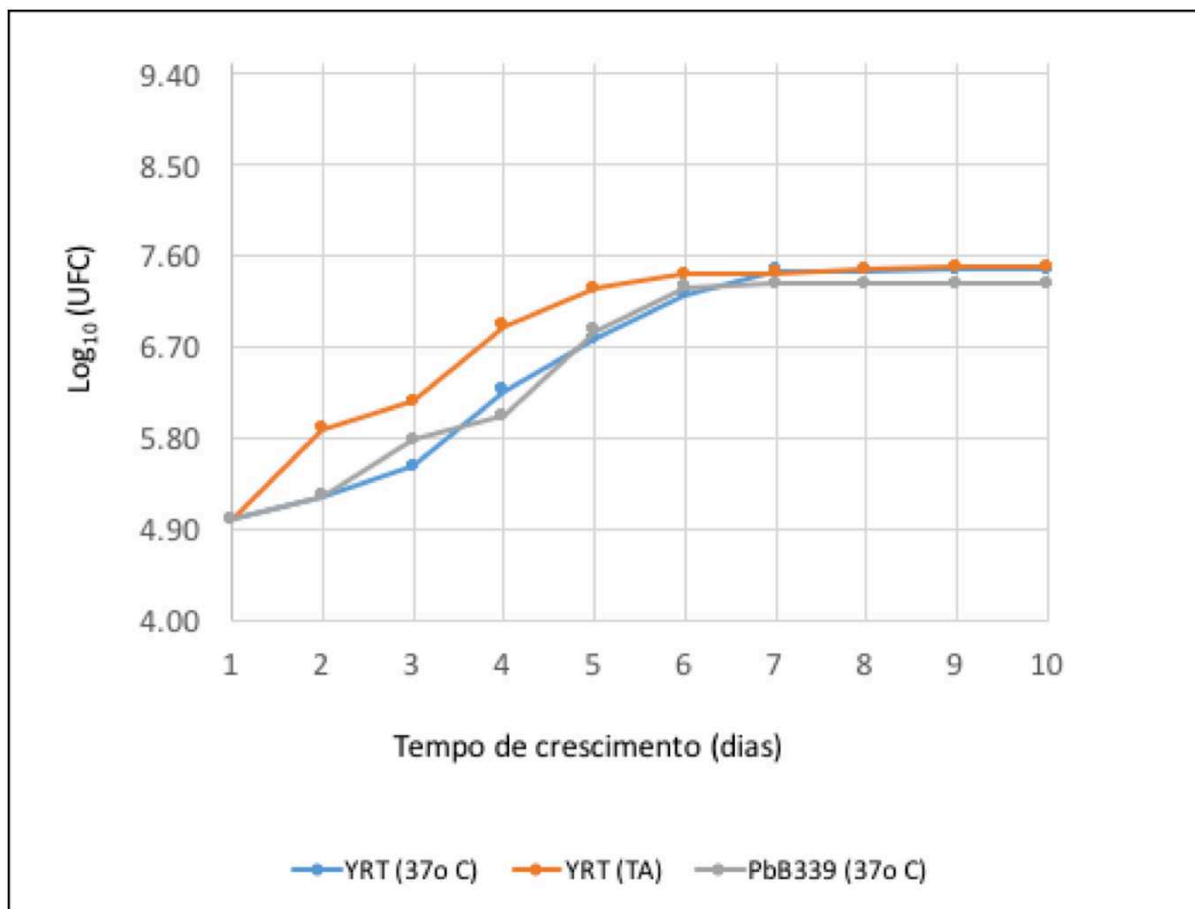
5.3.4 Cinética de crescimento do isolado YRT

Os ensaios de crescimento foram realizados na tentativa de estimar a fase logarítmica (fase log) de crescimento do isolado YRT. Três métodos foram aplicados nesse estudo, turbidimetria em conjunto com a contagem de totais e de células viáveis em câmara de câmara Neubauer, e contagem das unidades formadoras de colônia (UFC).

O crescimento característico de grumos celulares apresentado pela cultura YRT (Figura 9D e Figura 9C) em caldo YPD, comprometeu a leitura turbidimétrica e consequentemente, a contagem das células viáveis e totais, já que o meio líquido apresentou baixa turbidez e inúmeros grumos celulares que não se desfaziam mesmo com agitação, permanecendo no fundo do frasco.

Paralelamente, os ensaios realizados por meio da técnica de contagem de número de colônias em placas (UFC) em Ágar YPD, foi possível estimar os fases de crescimento do isolado YRT a 37° C e a TA (Figura 12). Inoculou-se uma concentração de $1-5 \times 10^5$ células em Ágar YPD e com o auxílio de uma alça em L espalhou-se a suspensão sobre o meio. A contagem foi realizada diariamente durante 10 dias por inspeção visual. O perfil de crescimento das culturas YRT a 37° C mostrou-se similar ao controle Pb339, iniciando a fase logarítmica (log) de crescimento nas primeiras 24 horas e se mantendo, com variações, até o 6° dia de crescimento. Por outro lado, comparativamente, a isolado YRT incubada a TA apresentou um crescimento mais acentuado ao longo do ensaio, mantendo-se na fase log até o 6° dia de crescimento. A tabela contendo as leituras pode ser consultada no Apêndice VIII (2-TabSuplementar_curva_crescimento.xls)

Figura 12. Curva de crescimento do isolado YRT e do isolado parental Pb339 a 37° C e à TA por contagem UFC



5.4 Confirmação da identidade do isolado atípico YRT por sequenciamento e por amplificação de marcadores moleculares específicos

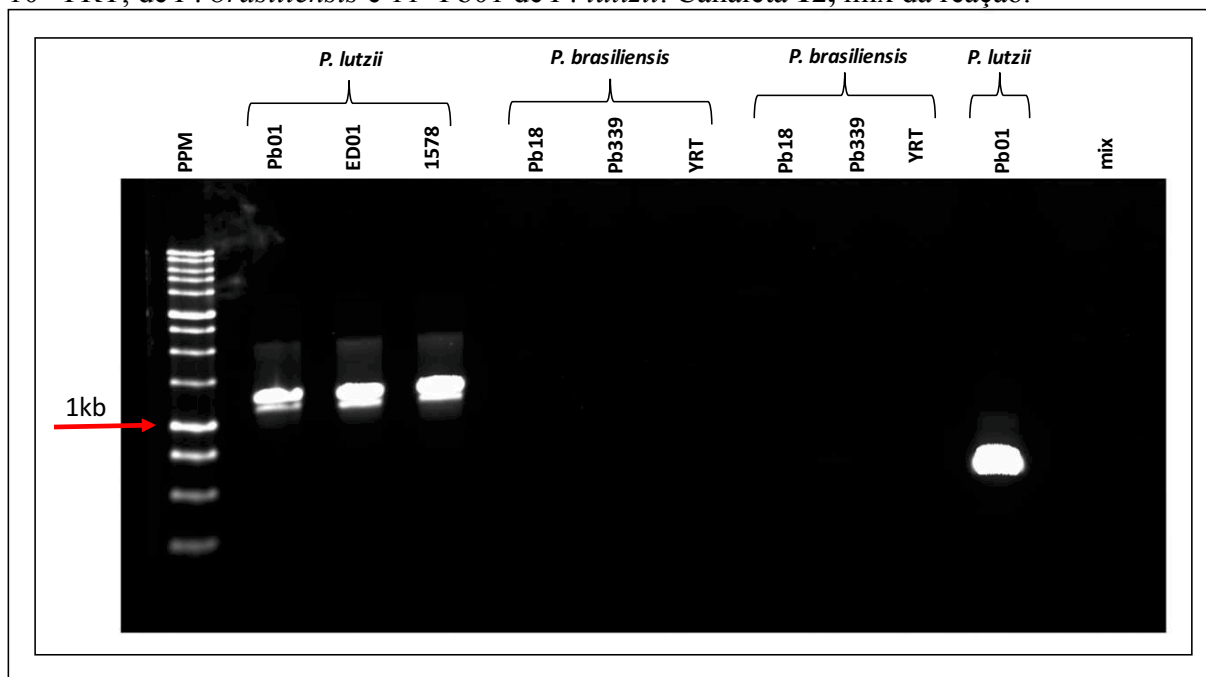
A necessidade de confirmar a identidade do isolado YRT por meio de marcadores moleculares decorreu da perda de duas das principais características morfo-fisiológicas utilizadas na identificação do gênero *Paracoccidioides*. Estas são a ausência de dimorfismo térmico nessa linhagem, associada à ausência de formas típicas em roda de leme nos cultivos, conquanto apresentem aspecto leveduriforme. As espécies crípticas são conceituadas como exemplares biológicos que não possuem diferenças morfológicas identificáveis por meio dos métodos empregados pela microbiologia clássica (morfológicos e fisiológicos), mas que geneticamente se mostram divergentes e estão reprodutivamente isoladas. Por métodos moleculares se podem distinguir as espécies *P. brasiliensis* de *P. lutzii*. Nesse ensaio, utilizaram-se iniciadores descritos na literatura (veja Materiais e métodos, Tabela 2, subitem

4.5.3), para confirmar a identidade do isolado YRT isolada a partir da amostra Pb339, previamente identificado como *P. brasiliensis* e diferenciável de isolados Pb01-like (*P. lutizii*).

Investigou-se no isolado YRT a presença dos marcadores moleculares Trem E (Marini *et al.*, 2010) e da região *indel* HSP70 (Teixeira *et al.*, 2009) específicos de *P. lutizii*. Os resultados da Figura 13 apresentam a resolução em gel de Ágarose 0,8% que confirma a presença de amplificação apenas nos isolados da espécie de *P. lutizii* (Figura 13).

Figura 13. Confirmação da identidade molecular do isolado YRT como pertencente a espécie *P. brasiliensis* por PCR convencional.

Resolução eletroforética em gel de Ágarose 0.8%; canaletas da esquerda para a direita, em 1 – PPM, padrão de peso molecular 1kb ladder. Em 2-6 amplificação do marcador TremE, onde 2=Pb01, 3=ED01 4=1578, de *P. lutizii*, 5=Pb18, 6=Pb339, 7=YRT, de *P. brasiliensis*. Canaletas de 8-11 amplificação da região *indel* do gene *hsp70*, onde 8=Pb18, 9=Pb339, 10=YRT, de *P. brasiliensis* e 11=Pb01 de *P. lutizii*. Canaleta 12, mix da reação.



Para a identificação molecular da espécie *P. brasiliensis*, os produtos da PCR convencional dos marcadores moleculares da região ITS 1 e ITS 4, NL1 e NL2, que possibilitam a identificação de gêneros de fungos, Trem G, um marcador exclusivo da espécie *P. brasiliensis* e segundo produto da amplificação por *Nested* PCR do gene imunodominante *gp43* do complexo *Paracoccidioides* foram sequenciados (Sanger) em triplicata. As amostras sequenciadas foram a isolado YRT e os isolados Pb339 e Pb18 da espécie *P. brasiliensis* e as

sequencias em formato fasta estão disponíveis nos Apêndices I e IX desse manuscrito (3-DadoSuplementar-PPC_identificacao_molecular_YRT).

As leituras foram submetidas a chamada de dados (*basecalling*) e todas as bases com valor de qualidade $Q < 20$ foram excluídas das análises e as sequencias consenso geradas. A análise comparativa foi realizada com o algoritmo BlastN (v 2.3.31+) local com os parâmetros de corte de *e-value* 10^{-6} e -F F (filtro de baixa complexidade desativado). As sequências consenso foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados não redundante (NR) de nucleotídeos (NCBI). O primeiro *hit* de cada comparação mostrou de identidade $\geq 92\%$ entre os nucleotídeos. Os resultados obtidos dessa análise confirmaram que a amostra YRT trata-se de um isolado pertencente ao gênero *Paracoccidioides*, considerando uma identidade $\geq 99\%$ e *e-value* $\leq 1e-6$ entre as sequências do complexo *Paracoccidioides*. Outro aspecto que confirmou esse achado foi que a sequência correspondente ao marcador molecular espécie específico Trem G, apresentou vários hits significativos com as sequências de Pb18, um isolado da espécie de *P. brasiliensis* (Figura 8)

Tabela 8. Resultados da análise comparativa com o algoritmo BLASTN para a confirmação da identidade molecular do isolado YRT

Amostras	Gene	# acesso (NR)	Tamanho da Query (pb)	Tamanho do alinhamento (pb)	Blast Hit	Score	e-value	identidade (%)	gaps	Coordenada inicial da query	Coordenada final da query	Coordenada inicial do subject	Coordenada final do subject
YRT	gp43	AB304681	355	354	Paracoccidioides brasiliensis gp43 gene for 43 kDa secreted glycoprotein precursor, partial cds, strain: IFM 41630	649 bits(351)	0.0	353/354(99%)	0/354(0%)	1	354	219	572
YRT	TremG	XM_010758451	1219	1071	Paracoccidioides brasiliensis Pb18 hypothetical protein partial mRNA	1893 bits(1025)	0.0	1057/1072(99%)	3/1072(0%)	149	1220	117	1185
YRT	ITS	AB304414	694	655	Paracoccidioides brasiliensis small subunit rRNA, ITS1, 5.8S ribosomal RNA, ITS2, large subunit rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 41620	1210 bits(655)	0.0	655/655(100%)	0/655(0%)	1	655	25	679
YRT	NL	AB304414	613	613	Paracoccidioides brasiliensis small subunit rRNA, ITS1, 5.8S ribosomal RNA, ITS2, large subunit rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 41620	1120 bits(606)	0.0	611/613(99%)	1/613(0%)	1	613	661	1272
PbB339	gp43	U26160	278	267	Paracoccidioides brasiliensis 43 kDa secreted glycoprotein precursor (gp43) gene, complete cds	494 bits(267)	5.00E-136	267/267(100%)	0/267(0%)	1	267	2834	2568
PbB339	TremG	XM_010758451	1297	1116	Paracoccidioides brasiliensis Pb18 hypothetical protein partial mRNA	2008 bits(1087)	0.0	1109/1119(99%)	3/1119(0%)	152	1268	117	1234
PbB339	ITS	KJ540975	381	207	Paracoccidioides brasiliensis strain Pb339 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	289 bits(156)	8.00E-78	191/208(92%)	1/208(0%)	175	382	126	332
PbB339	NL	XR_001551846	555		Paracoccidioides lutzii Pb01 28S ribosomal RNA rRNA	1027 bits(556)	0.0	556/556(100%)	0/556(0%)	1	556	451	1006
Pb18	gp43	AB047694	407	356	Paracoccidioides brasiliensis gp43 gene for 43 kDa secreted glycoprotein precursor, partial cds,	647 bits(350)	0.0	354/356(99%)	0/356(0%)	1	356	217	572
Pb18	TremG	XM_010758451	1269	1118	Paracoccidioides brasiliensis Pb18 hypothetical protein partial mRNA	2021 bits(1094)	0.0	1111/1119(99%)	1/1119(0%)	1	1118	117	1235
Pb18	ITS	AB304414	585	585	Paracoccidioides brasiliensis small subunit rRNA, ITS1, 5.8S ribosomal RNA, ITS2, large subunit rRNA, partial and complete sequence, strain	1074 bits(581)	0.0	584/585(99%)	1/585(0%)	1	585	97	680
Pb18	NL	AB304414	592	592	Paracoccidioides brasiliensis small subunit rRNA, ITS1, 5.8S ribosomal RNA, ITS2, large subunit rRNA, partial and complete sequence	1094 bits(592)	0.0	592/592(100%)	0/592(0%)	1	592	673	1264

5.5 Aspectos ultraestruturais do isolado YRT e do isolado parental Pb339

Para a análise ultraestrutural do isolado YRT e do isolado Pb339 foram cultivadas em Ágar YPD a TA e a 37° C. As células foram coletadas cuidadosamente com 5 dias de crescimento e fixadas e preparadas de acordo com a técnica de microscopia eletrônica empregada (veja Materiais e Métodos, item 4.4.2).

5.5.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A superfície celular do isolado YRT foi examinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e comparada às células do isolado parental Pb339 (Figura 14 e Figura 15). As características usuais de *P. brasiliensis*, isolado Pb339, cultivados 37°C e à TA, foram identificadas nas Figuras 15A e 15B, respectivamente, onde foi possível observar a distinta morfologia influenciada pelas condições de temperatura. As leveduras (Figura 14A) apresentam aspectos característicos de roda de leme em função da manutenção da aderência das células filhas à célula mãe, bem como a presença de células alongadas e com múltiplos brotamentos, após 5 dias de cultivo. Foi possível avaliar o estágio filamentososo marcado pela presença de hifas delgadas septadas observando-se estruturas de clamidósporos terminais ou intercalares, após 15 dias de cultivo (Figura 14B).

À MEV, a transição morfológica não foi registrada quando da observação celular de amostras do isolado YRT, cultivadas a 37°C e à TA (Figura 15). Independente das condições de temperatura, a morfologia das células é heterogênea, mas com características de leveduras, possuindo formas ovoides ou catenuladas, com pequenos brotamentos e grumadas, como apresentadas nos campos das figuras 16A e 16B. Além disso, foram observados campos contendo estruturas semelhantes a pseudo-hifas ao invés das típicas estruturas de “roda de leme”.

Figura 14. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do isolado Pb339 de *P. brasiliensis*.

A – leveduras com 5 dias de crescimento, (X 800); **B** – Micélio com 15 dias de crescimento; setas brancas: clamidósporos terminais e intercalares (X 1.300).

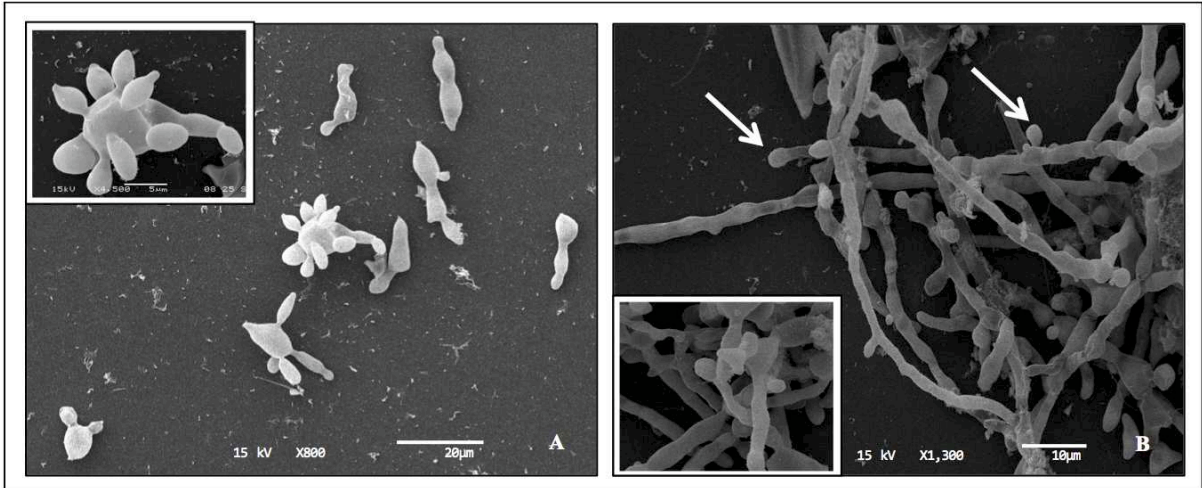
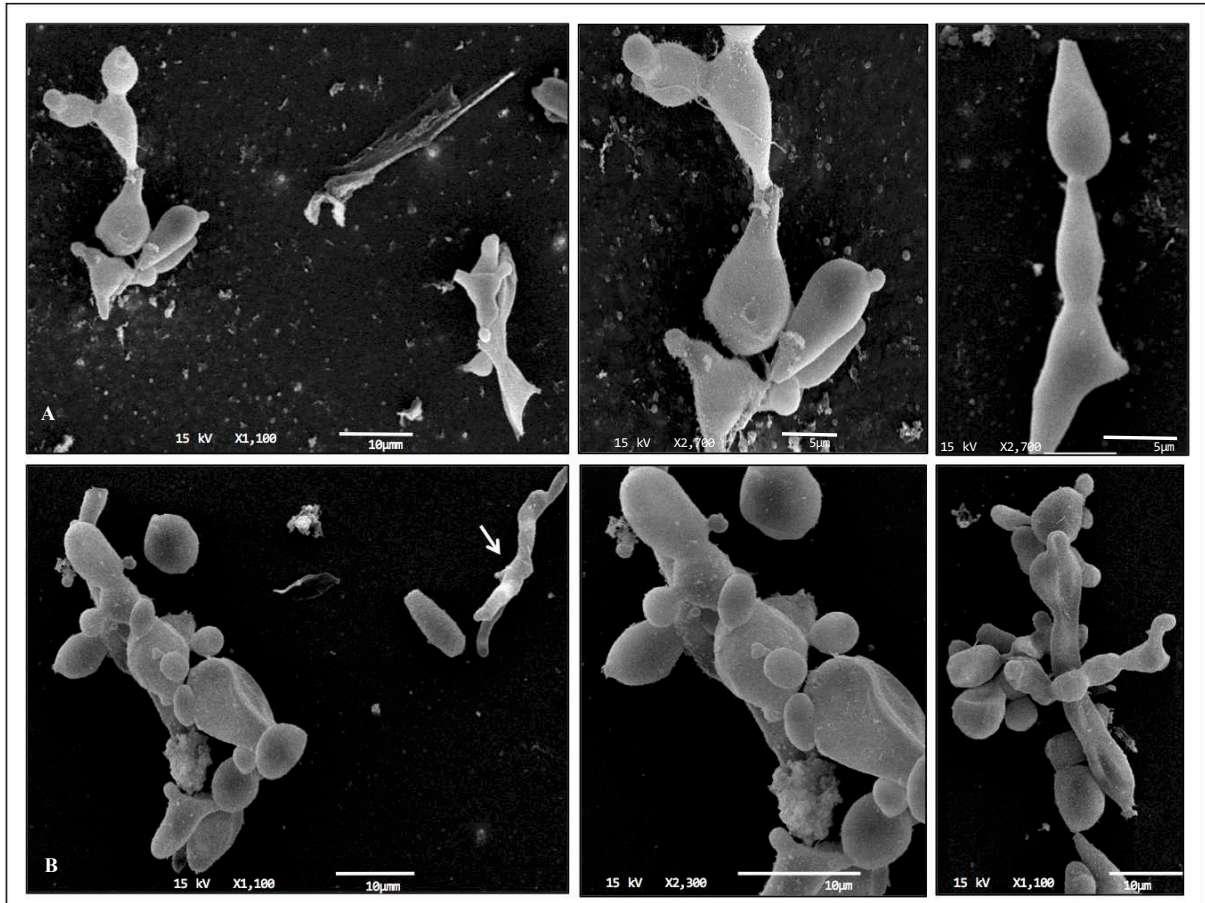


Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do isolado YRT de *P. brasiliensis*.

A - forma L a 37°C, 5 dias de crescimento, (X 1.100); **B** – forma L a TA, 5 dias de crescimento, (X 1.100); seta branca: hifa.



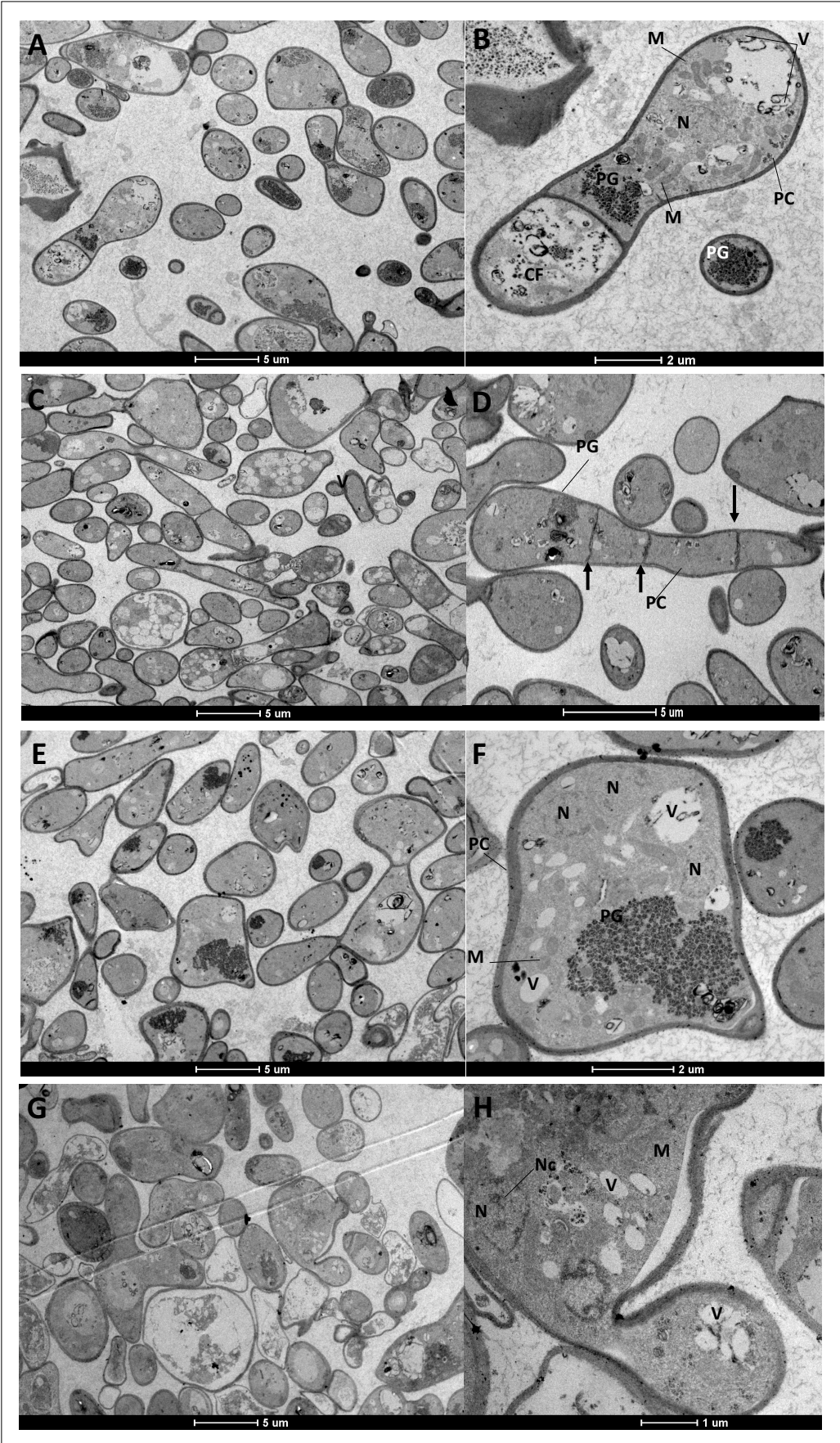
5.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os aspectos ultraestruturais do isolado Pb339 de *P. brasiliensis* cultivado à temperatura ambiente e a 37°C, revelaram-se compatíveis com a morfologia intracelular usualmente descrita para o fungo. As leveduras em sua maioria apresentam aspecto ovoide, apresentando brotamentos (1-2 células filhas), como apresentado na Figura 16A. Nota-se a presença de partículas de glicogênios concentradas nos polos celulares ou distribuídas por toda a célula. Observa-se numerosas organelas mitocondriais que tendem a se acumular na periferia celular, sendo esta uma característica de células jovens (Figura 16B). Diferente das leveduras, as hifas apresentaram baixa concentração de partículas de glicogênio, porém, foi possível observar uma grande quantidade de células repletas de vacúolos lipídicos (Figura 16A), além da presença de septos observados nos cortes longitudinais (Figura 16B).

As células leveduriformes de YRT, independente da temperatura, apresentaram morfologia irregular, presença de partículas de glicogênio concentradas na margem celular, vacúolos lipídicos distribuídos ao longo da célula e organelas mitocondriais concentradas nas regiões periféricas (figuras 17E, 17F, 17G e 17H).

Figura 16. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das características ultraestruturas gerais do fungo *P. brasiliensis*.

Em **A** – Morfologia L do isolado Pb339 com 5 dias de crescimento a 37° C. Note-se células ovoides, de tamanhos variados, presença de alto conteúdo de partículas de glicogênio, (mag. 2900 X). . Em **B** –Foco da célula L (Pb339), (mag. 6800 X), secção longitudinal. Note-se regiões com acúmulos de mitocôndrias (M), presença de núcleo (N), vacúolo (V), partículas de glicogênio (PG) e parede celular (PC). Presença de um brotamento ou célula filha (CF). Em **C** – Morfologia M do isolado Pb339 com 5 dias de crescimento a TA, (mag. 2900 X). Note-se a presença de numerosos vacúolos (V) nas estruturas. Em **D** – Secção longitudinal, foco da estrutura de hifa (Pb339), (mag. 4800 X). Observe a presença de septos (setas), parede celular (PC) e pequenas porções de partículas de glicogênio (PG). Em **E** – Morfologia L do isolado YRT com 5 dias de crescimento a 37° C. Nota-se a presença de células de formatos irregulares contendo partículas de glicogênio e vacúolos lipídicos (mag. 2900 X). Em **F** – Secção transversal da célula L (YRT), verifica-se a presença de 3 núcleos (N), mitocôndrias (M), vacúolos lipídicos (V), partículas de glicogênio (PG) e parede celular (PC), (mag. 13000 X). Em **G** – Morfologia L do isolado YRT com 5 dias de crescimento à TA. Note a presença de células com formatos irregulares (mag. 2900 X). Em **H** – Secção longitudinal da célula L (YRT), presença de núcleo (N) e nucléolo (Nc), vacúolos lipídicos (V) e partículas de glicogênio (PG), (mag. 6800 X).



P6339 - 37°C

P6339 - TA

YRT - 37°C

YRT

5.6 Quantificação de quitina na parede celular e dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos isolados Pb339 e YRT

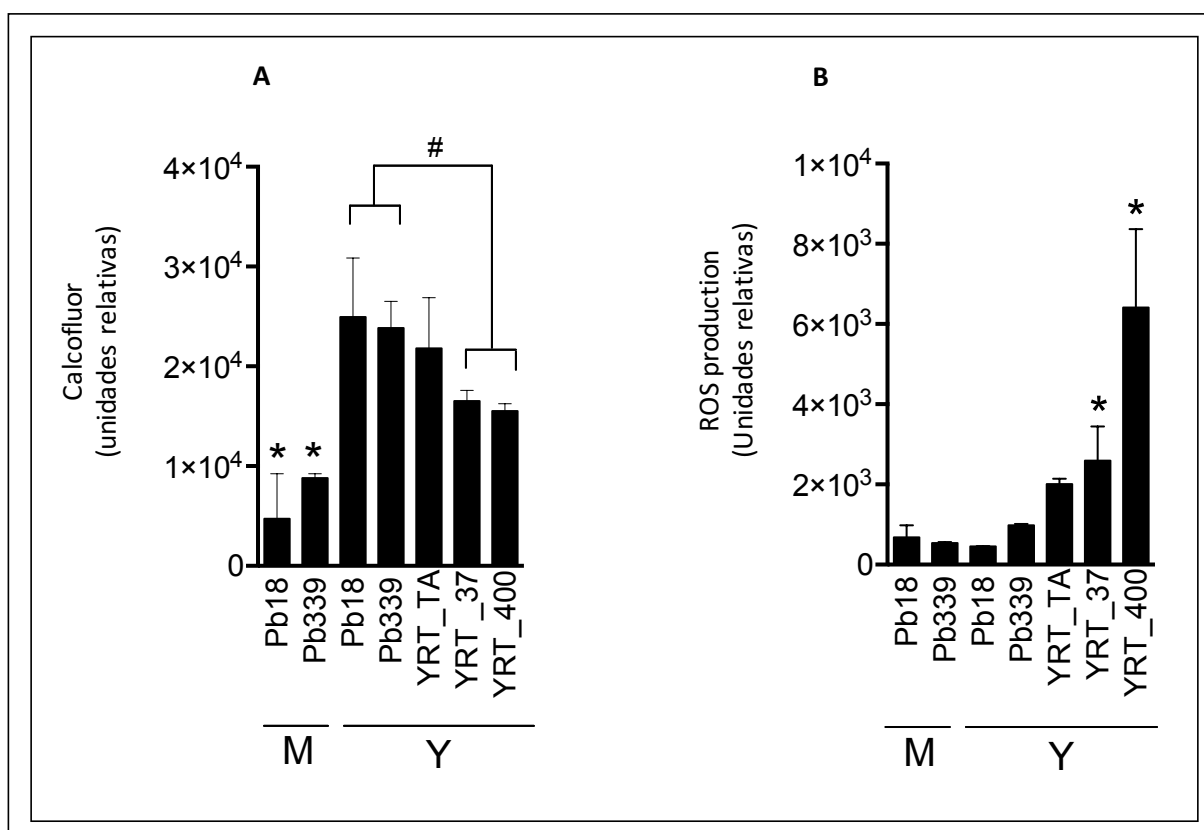
Investigaram-se os níveis de quitina na parede celular e de espécies reativas de oxigênio (ROS) do isolado YRT em diferentes condições experimentais, na presença e na ausência de sulfametoxazol. Como controle experimental, utilizaram-se os isolados Pb339 e Pb18 de *P. brasiliensis* (Figura 17).

No teste de quantificação de quitina, os controles Pb18 e Pb339 na forma M, apresentaram níveis significativamente reduzidos ($p < 0.05$). Já na forma L, os isolados controle apresentaram níveis significativamente maiores do que os do isolado YRT a 37° C e na presença da 400 µg de sulfametoxazol cultivada a TA por 5 dias. Quanto cultivada a TA 15 dias esse isolado revelou níveis de quitina sem aumento significativas entre as amostras (Figura 17A).

No ensaio de ROS, independente da morfologia, identificou-se a presença de espécies reativas de oxigênio mas sem diferenças significativa entre as amostras controle. A amostra YRT (15 dias de crescimento a TA apresentou níveis maiores que os controles, mas sem diferenças significativas. Contudo, a 37° C esse isolado apresenta aumento significativo ($p < 0.05$) dos níveis de ROS. Na presença do antimicrobiano sulfametoxazol (YRT400) a TA, os níveis ROS também são elevados e significativos ($p < 0.05$), apresentando-se maiores do que todas as amostras (Figura 17B).

Figura 17. Níveis de quitina e ROS na isolado YRT em diferentes condições experimentais.

Em **A** – Avaliação dos níveis de quitina do isolado YRT e em **B** - Ensaio de ROS. As amostras Pb18, Pb339 e YRT_37_5D foram cultivadas a 37° C. Os isolados Pb18 e Pb339 L (cultivada por 5 dias a 37° C) e M (cultivada por 15 dias a TA) de *P. brasiliensis* foram utilizados como controle; as amostras YRT (cultivada por 15 dias a TA), YRT_37° C (cultivada por 5 dias a 37° C); YRT400 cultivada a TA na presença de 400 µg de sulfametoxazol; *p-valor<0,01, #p-valor<0,0001.



5.7 Sobrevivência e estabilidade do fenótipo do isolado YRT em animais de experimentação

5.7.1 Determinação da carga fúngica pulmonar do isolado atípico YRT e estabilidade do fenótipo

Inicialmente, avaliou-se a carga fúngica no pulmão dos animais após três dias de infecção com as diferentes amostras do fungo *P. brasiliensis*. Os resultados mostraram a presença de leveduras viáveis da amostra Pb18 recuperadas no pulmão dos animais após três

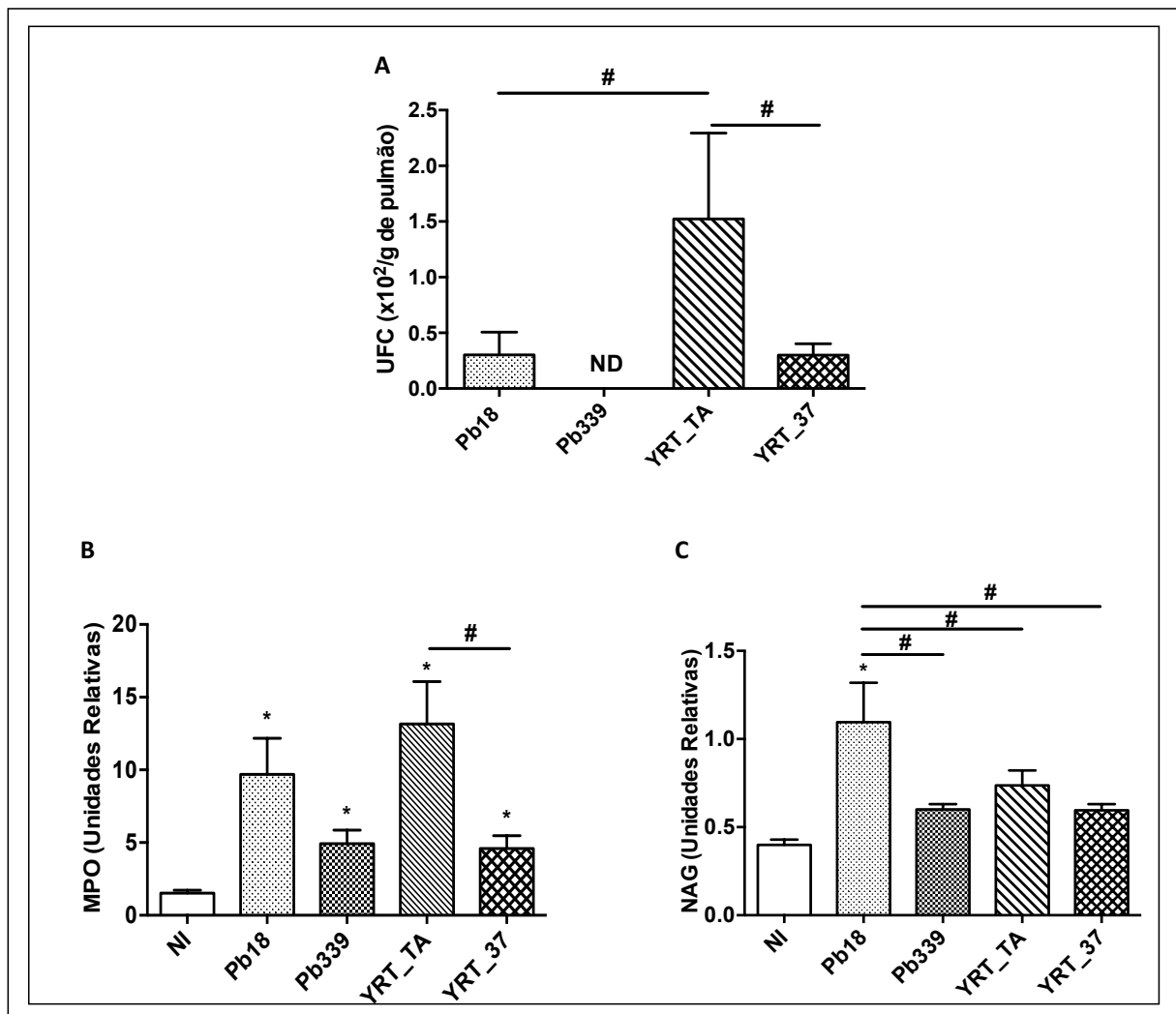
dias de infecção. Não foi observada a recuperação de colônias fúngicas da amostra Pb339 no pulmão dos animais após três dias de infecção (Figura 18A). Em relação à amostra YRT a TA, observou-se a recuperação de colônias fúngicas no pulmão dos animais após três dias de infecção. Na comparação com a amostra Pb18, foi observada maior carga fúngica recuperada do pulmão dos animais infectados com a amostra YRT a TA. Além disso, foi observada maior carga fúngica recuperada do pulmão dos animais infectados com a amostra YRT a TA em comparação com a amostra YRT a 37° C. Vale ainda destacar que o fenótipo YRT manteve-se estável, apresentando-se na forma leveduriforme à TA.

5.7.2 Avaliação da infiltrado inflamatório no pulmão dos animais após infecção com as diferentes amostras de *P. brasiliensis*

O acúmulo de leucócitos nos pulmões foi quantificado utilizando ensaios que avaliam a atividade de enzimas presentes em certas populações celulares, como a mieloperoxidase (MPO), enzima com expressão elevada em neutrófilos, e a N-acetil-glicosaminidase (NAG), presente em macrófagos, cujas atividades são usadas como uma medida indireta da presença dessas células nos tecidos (Figura 18B). Inicialmente, observou-se que a infecção com as amostras Pb18, Pb339, YRT_TA_15D e YRT_37_5D induziu aumento significativo de neutrófilos no pulmão dos animais após três dias de infecção em relação ao grupo de animais não infectados (Figura 16 A). Foi verificado acúmulo significativo de neutrófilos no pulmão dos animais infectados com a amostra YRT_TA_15D em relação aos animais infectados com a amostra YRT_37_5D (Figura 15 A). Com relação ao acúmulo de macrófagos, observou-se que a infecção com a amostra Pb18 induziu aumento significativo de neutrófilos no pulmão dos animais após três dias de infecção em relação ao grupo de animais não infectados (Figura 18C). Além disso, a infecção com as amostras Pb339, YRT_TA_15D e YRT_37_5D resultou em menor acúmulo de macrófagos no pulmão dos animais após três dias de infecção em comparação com os animais infectados com a amostra Pb18 (Figura 18B).

Figura 18. Avaliação da carga fúngica pulmonar e do infiltrado inflamatório.

Em **A** - Carga fúngica pulmonar observada após infecção dos animais com as diferentes amostras de *P. brasiliensis*; animais C57BL/6 foram inoculados pela via intranasal com 10^6 leveduras das amostras Pb18, Pb339, YRT cultivadas à TA e YRT a 37°C de *P. brasiliensis*. Após três dias de infecção, os animais foram eutanasiados e fragmentos de pulmão foram macerados e semeados em placas de Petri contendo meio de cultura BHI suplementado. As placas foram mantidas em estufa 37°C e as colônias fúngicas contadas após 20 dias de incubação. Os resultados estão expressos como média \pm SEM (n=6 animais por grupo). #p<0,05 (diferença significativa entre os grupos representados). Em **B** - Infiltrado inflamatório após infecção dos animais com as diferentes amostras de *P. brasiliensis*; Inocularam-se em animais C57BL/6, pela via intranasal, 10^6 leveduras das amostras Pb18, Pb339, YRT a TA e YRT a 37°C de *P. brasiliensis*. Após três dias de infecção, os animais foram eutanasiados para coleta do pulmão e avaliação da atividade de MPO (A) e NAG (B). Animais não infectados (NI) receberam 30 μL de PBS estéril pela mesma via de inoculação. Os resultados estão expressos como média \pm SEM (n=6 animais por grupo). *p<0,05 (diferença estatística em relação ao grupo NI). #p<0,05 (diferença estatística entre os grupos representados).



5.8 Resultados dos ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) de antimicrobianos frente à isolado YRT

O objetivo desse ensaio foi determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos anfotericina B, itraconazol, cetoconazol, fluconazol, sulfametoxazol, bactrim e terbinafina frente à isolado YRT, em diferentes condições experimentais. Com a finalidade de comparar a suscetibilidade dessa isolado com outras amostras de *Paracoccidioides*, foram utilizadas três amostras clínicas de *P. brasiliensis* (Pb339, Pb03 e Pb18), uma de *P. lutzii* (Pb01) e como controle geral do experimento, utilizou-se uma amostra *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e outra de *Candida krusei* (ATCC 6258), conforme protocolo estabelecido CLSI M27-A2.

5.8.1 Determinação da CIM em caldo RPMI

Os resultados de CIM em caldo RPMI estão apresentados na tabela 8 a seguir. As colunas CIM50 e CIM 90 representa as concentrações dos antimicrobianos que inibiram o crescimento das amostras em 50% e 90%. A avaliação da suscetibilidade foi realizada de acordo com a atividade inibitória (fungistática) da droga considerando a presença de crescimento residual e contínuo da cultura, confirmada por pequenas colônias. A Tabela 8 apresenta os para CIM50 e CIM90 das amostras incubadas a 37° C e a TA, com leituras feitas com 7, 10 e 15 dias de crescimento (Tabela 9).

Tabela 9. Determinação da concentração inibitória mínima de drogas para a isolado YRT em caldo RPMI a TA e a 37° C.

Samples	Medium (temp.)	Incubation time (days)	MIC (mg/L)													
			Anfotericin B		Itraconazole		Ketoconazole		Fluconazole		Sulfamethoxazole		Bactrim®		Terbinafina	
			50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%
PbB339	RPMI (T.A.)	7	--	--	0.0039	0.0039	0.00195	0.00195	0.5	0.5	37.5	75	37.5	37.5	0.0156	0.03125
		10	--	--	0.0039	0.0039	0.00195	0.00195	0.5	0.5	37.5	75	37.5	150	0.125	0.5
		15	--	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039	0.00195	0.00195	0.5	0.5	37.5	150	37.5	150	0.125
YRT	RPMI (T.A.)	7	0.015	0.015	0.0039	0.0039	0.00195	0.00195	0.5	0.0078	75	150	300	300	0	0.0156
		10	0.015	0.015	0.0039	0.0039	0.00195	0.00195	0.5	0.0078	75	300	300	300	0.0625	0.25
		15	0.015	0.015	0.0039	0.0039	0.00195	0.00195	0.5	0.0078	75	300	300	300	0.0625	0.25
PbB339	RPMI (37° C)	7	0.03125	0.03125	0.0039	0.0039	--	--	0.25	0.5	75	75	18.75	37.5	0.0078	0.0156
		10	0.03125	0.03125	0.0039	0.0039	1.0	2.0	0.5	0.5	150	150	150	150	0.0625	0.125
		15	0.03125	0.03125	0.0039	0.0039	1.0	2.0	0.5	0.5	150	150	150	150	0.0625	0.125
YRT	RPMI (37° C)	7	0.03125	0.03125	0.0039	0.0039	--	--	0.0078	0.0078	150	300	75	150	0.03125	0.125
		10	0.062	0.062	0.0039	0.0039	0.5	1.0	0.0078	0.0078	150	300	75	150	150	0.25
		15	0.062	0.062	0.0039	0.0039	0.5	1.0	0.0078	0.0078	150	300	75	150	150	0.25

5.9 Influência das condições nutricionais na estabilidade do fenótipo atípico do isolado YRT: níveis de glicose e crescimento em meio mínimo

5.9.1 Ensaio com ágar YP (Extrato de levedura, Peptona)

O objetivo foi avaliar a capacidade de crescimento e a manutenção do fenótipo leveduriforme do isolado YRT quando desafiada em concentrações de D-glucose no nível fisiológico humano (0.1%) e na ausência desse nutriente (Buu e colaboradores, 2014 com modificações) quando cultivado nas temperaturas ambiente e de 37° C (Tabela 10).

O isolado controle parental Pb339 (Tabela 10) apresentou morfogênese completa em todas as condições avaliadas nesse ensaio, com exceção do micélio quando incubado a 37° C na ausência de D-glucose, observando-se hifas e células leveduriformes.

Em ambas as condições de temperatura as amostras YRT apresentaram tempo de crescimento lento, quando cultivadas a uma concentração de 0,1% de D-glucose. Na ausência de D-glucose, a 37° C, não se observou crescimento. Além disso, a 37° C a morfologia celular observada ao longo do experimento foi similar a pseudo-hifa (Figura 19), já a TA observaram-se células ovóides e a presença de um número relativamente pequeno de hifas a partir do 10° dia de crescimento (Figura 20). A reversão parcial do fenótipo ocorreu nas culturas incubadas a TA, na presença de 0,1% de D-glucose, entretanto, a morfogênese completa pode ser observada nas culturas crescidas na ausência desse componente no 15° dia de crescimento (Tabela 10, Figura 20).

O isolado Pb339 (Tabela 10) apresentou morfogênese completa em todas as condições avaliadas nesse ensaio, com exceção do micélio quando incubado a 37° C na ausência de D-glucose, observando-se hifas e células leveduriformes.

Na ausência de D-glucose a 37° C as culturas de YRT não apresentaram crescimento observável até o 15° dia, mas a TA, apresentaram conversão parcial de L → M observando-se, a partir do 10° dia de crescimento, um halo de micélio circundando a cultura leveduriforme (Figura 21A).

Tabela 10. Avaliação do crescimento do isolado YRT em condição fisiológica humana de D-glucose (0.1%) e na ausência desse componente

Amostra	Temperatura (°C)	Tempo de crescimento (dias)	Concentração de D-glucose	Crescimento	Morfologia
PbB339	TA → 37° C	5	1.5%	+	M, L
		10		+	L
		15		+	L
	TA → 37° C	5	0.1%	+	---
		10		+	M, L
		15		+	L
	TA → 37° C	5	0.0%	+	---
		10		+	M, L
		15		+	M, L
37° C → TA	5	1.5%	+	L, M	
	10		+	L, M	
	15		+	M	
37° C → TA	5	0.1%	+	L, M	
	10		+	L, M	
	15		+	M	
37° C → TA	5	0.0%	+	L, M	
	10		+	M	
	15		+	M	

L = Levedura

M = Micélio

+ presença de crescimento

--- ausência de crescimento

→ alteração da temperatura

Amostra	Temperatura (°C)	Tempo de crescimento (dias)	Concentração de D-glucose	Crescimento	Morfologia
YRT	TA → 37° C	5	1.5%	+	L
		10		+	L
		15		+	L
	TA → 37° C	5	0.1%	+	---
		10		+	L
		15		+	L
	TA → 37° C	5	0.0%	-	---
		10		-	---
		15		-	---
	37° C → TA	5	1.5%	+	L
		10		+	L
		15		+	L
	37° C → TA	5	0.1%	+	---
		10		+	L, M
		15		+	L, M
37° C → TA	5	0.0%	+	---	
	10		+	L, M	
	15		+	M	

Figura 19. Fotodocumentação do isolado YRT cultivada em Ágar YP com 0.1% de D-glucose a 37° C.

Em **A** – campo apresentando a isolado YRT com 10 dias de crescimento. Note as células irregulares, ovais e catenuladas com características sugestivas de pseudo-hifas. Em **B** – Campo apresentando morfologia irregular. Note a presença de brotos (1-2). Aumento de 400 X e 1000X (em óleo de imersão).

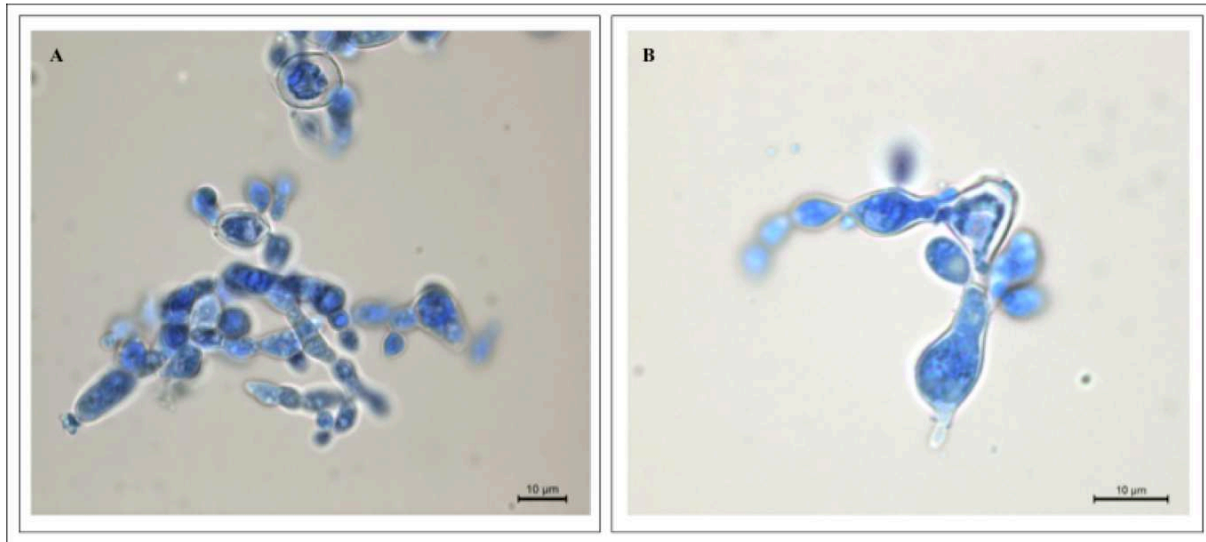


Figura 20. Fotodocumentação do isolado YRT cultivada em Ágar YP com 0.1% de D-glucose a TA.

Em **A** – campo apresentando a isolado YRT com 10 dias de crescimento. Note as células agrupadas em grumos, irregulares e ovais. Em **B** – Campo apresentando formas catenuladas e ovais (retângulo vermelho) com 10 dias de crescimento, destacando-se a presença de hifas (setas pretas). Aumento de 400 X.

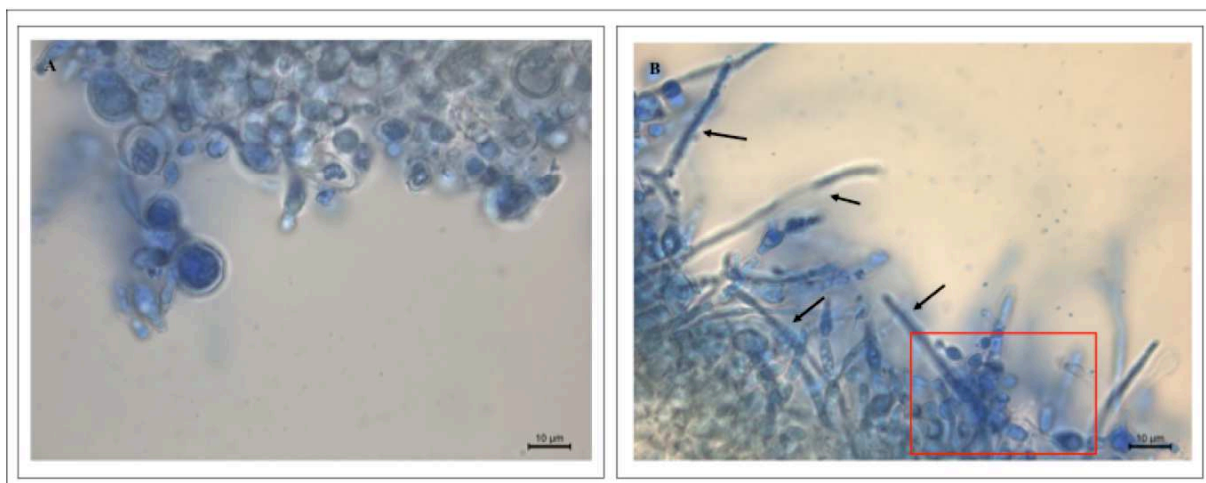
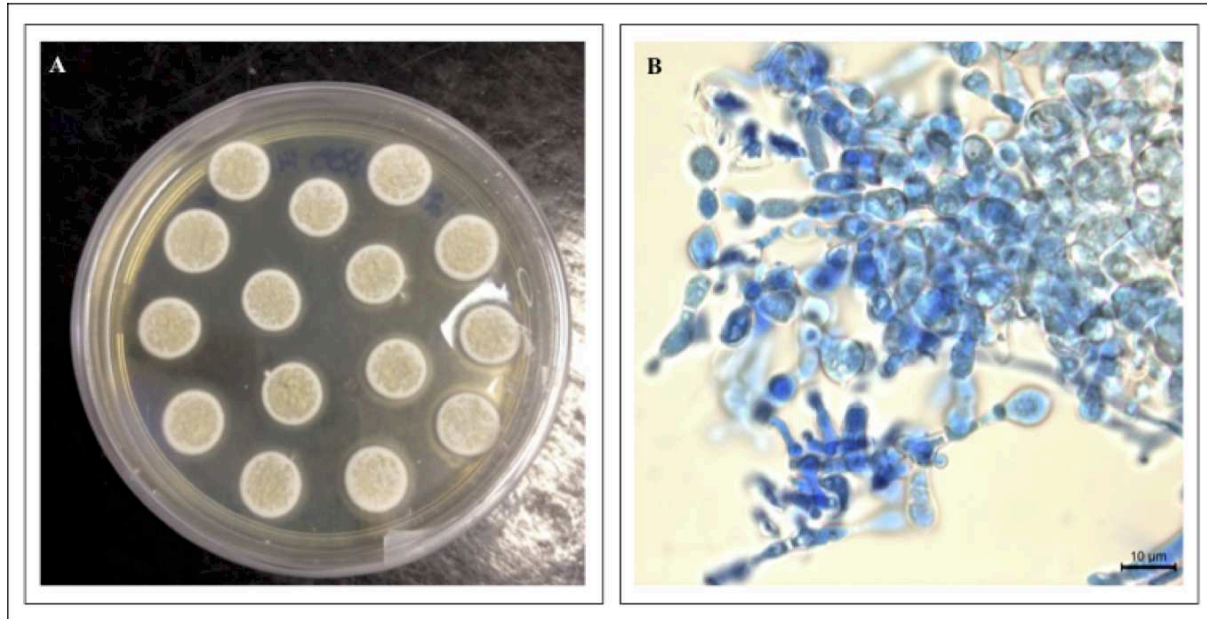


Figura 21. Fotodocumentação da cultura YRT crescida Ágar YP na ausência de D-glucose. Em **A** – culturas mistas de L e M. Note o aspecto leveduriforme mais ao centro e a presença de um alo de hifas contornando as culturas. Em **B** – microscopia ótica da cultura, células retiradas da porção central da cultura. Note no campo a presença de hifas. Aumento de 400X.



5.9.2 Ensaio com o meio mínimo sintético (S e SD)

Os resultados observados nos meios mínimos Ágar sintético (S) (yeast nitrogen base) e Ágar sintético D-glucose (SD) (yeast nitrogen base acrescido de 2% D-glucose) mostraram que as culturas YRT a 37°C, até o 15º dia de observação, não apresentaram crescimento. Em contrapartida as amostras do isolado Pb339, que apesar de crescerem lentamente, apresentaram células com morfologia L. Por outro lado a TA observou-se um lento crescimento do isolado YRT e a reversão fenotípica, com morfogênese completa para a forma M, assim como nas culturas do isolado Pb339.

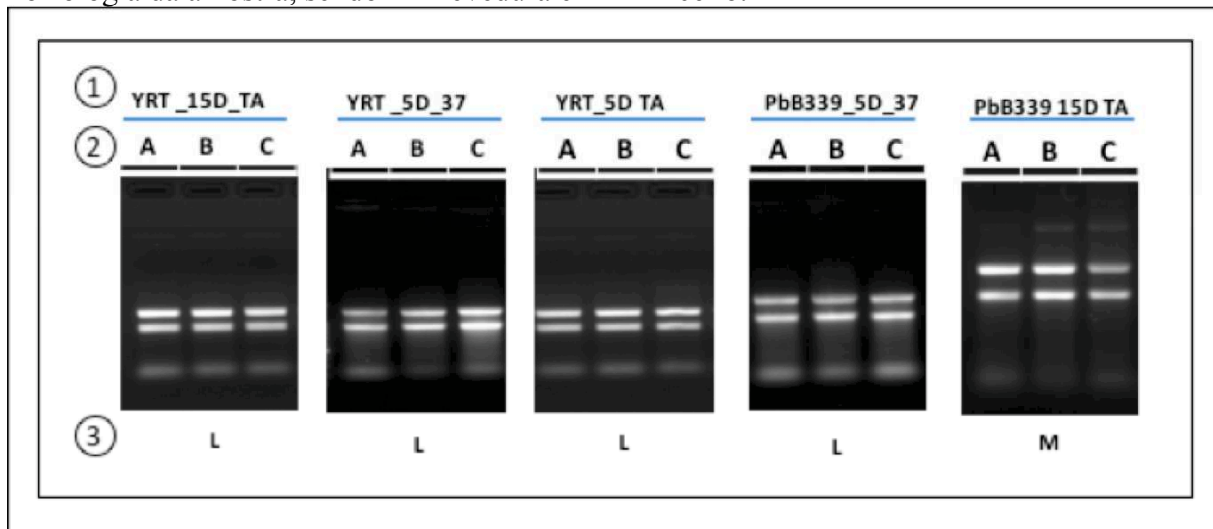
5.10 Avaliação qualitativa e quantitativa do RNA total extraído para análises de diferença de expressão

Estimou-se em espectrofotômetro (NanoDrop 1000) a razão da absorbância (Abs260/Abs280 nm) do RNA total extraído de todas as amostras que ficou entre 1.9 e 2.1 indicando a ausência de interferentes com o proteínas e compostos fenólicos. Em seguida, para avaliação prévia da integridade do RNA, as bandas das subunidades ribossomais 18S e 28S foram resolvidas em gel de Agarose 1.8% acrescido de 0.01% de hipoclorito PA (NaClO) para a inativação de RNases (Figura 22).

Para uma confirmação com maior precisão da dosagem e da integridade do RNA a plataforma AgilentBioanalyzer 2100 foi utilizada. A Tabela do Apêndice VI apresenta a quantificação do RNA total, com valores entre 84 e 355 ng/ μ L, e os valores de RIN (RNAIntegrityNumber) que ficaram entre 6,50 e 7,30 (Apêndice VI e Apêndice VIII, 4-FigSuplementar-bioanalyzer).

Figura 22. Avaliação prévia da integridade das amostras de RNA total por eletroforese em gel de Agarose em condições desnaturantes (NaClO).

Em 1 – Identificação das amostras: YRT = *Yeast at Room Temperature*, 5D = 5 Dias de crescimento, 15D = 15 Dias de crescimento, 37 = 37°C, TA = Temperatura Ambiente, Pb339 = Isolado parental. Em 2 – as letras A, B e C representam as triplicatas biológicas. Em 3 – morfologia da amostra, sendo L = levedura e M = micélio.



II - Análises computacionais

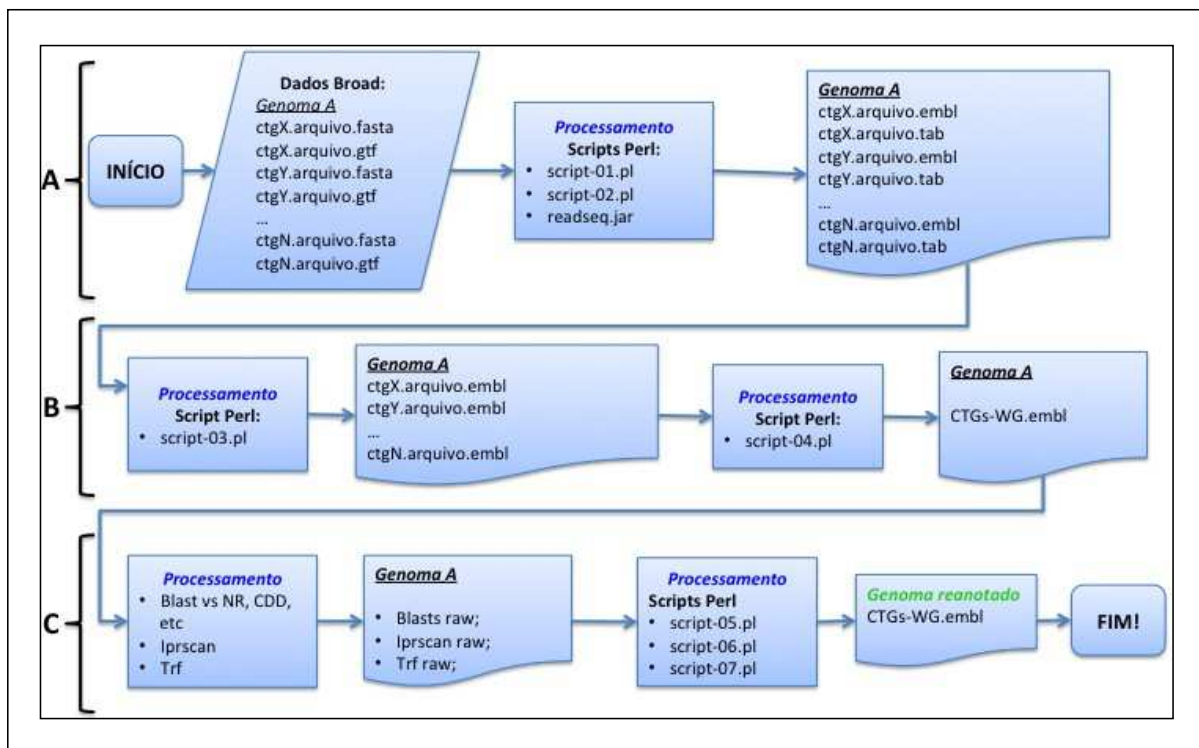
5.11 Re-anotação dos genomas de *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01, Pb03 e Pb18.

A reanotação de genomas previamente publicados tem se mostrado importante para as análises dos dados de RNASeq (Torres-Oliva *et al.*, 2016). Mesmo com a segunda versão dos genomas de *Paracoccidioides* (Pb01, Pb03 e Pb18) disponível (Muñoz *et al.*, 2014), o número de genes anotados como hipotético chega a 40% , como é o caso do genoma Pb18, utilizado como referência nesse trabalho. Nesse contexto, desenvolveu-se um *pipeline* para a re-anotação funcional e integração de dados dos genomas de *Paracoccidioides* (Pb01, Pb03 e Pb18) disponíveis na base de dados do Broad Institute¹, escrito em linguagem de programação *Perl* (Figura 23). Além do ganho na reanotação desses genomas, o *pipeline* pode ser empregado a outros modelos de genoma eucarioto e pode ser adaptado para genomas de procaríotos. Resumidamente, a etapa A representa o processamento e integração dos arquivos de sequências no formato *fasta* e o formato de anotação de sequências *gtf* em um único arquivo e conversão para o formato de anotação de sequências *embl* com toda informação genômica disponível (anotação dos genes) (Figura 23A). Na etapa B gerou-se um arquivo único representando o genoma completo com os contigs concatenados e ordenados numericamente. A informação referente às coordenadas originais foram mantidas (Figura 23B). A última etapa (Figura 23C), representa a etapa de reanotação envolvendo busca por similaridade de sequências com o auxílio da ferramenta BlastX contra as bases de dados NR-noPb (base de dados NR sem os genomas do complexo *Paracoccidioides*), CDD, Pfam, InterProScan com cópias de 15 bancos de assinaturas e famílias proteicas instalados em servidor local. Os identificadores usados na anotação dos genomas de *Paracoccidioides* definidos pelo Broad Institute foram associados ao número GI (Número de acesso do NCBI) do NRdb do NCBI. Ao final do processo, uma tabela hiperlinkada (vide Apêndice IX, 5-TabSuplementar-Reanotacao-pb18) foi gerada contendo os identificadores das duas bases de dados associados, Broad e NR, cuja anotação do primeiro hit foi considerada. Essa estratégia mostrou-se consistente e mais informativa especialmente quando a anotação foi integrada com a anotação das outras bases de dados mencionadas anteriormente. Dos 3356 (~40%) genes de Pb18 anotados como hipotéticos, 480 genes foram re-anotados (14%) com função predita. Com reação aos genomas de Pb01 e Pb03 contendo 35-40% dos genes anotados

como hipotéticos, quando re-annotados, apresentaram um ganho de 13% e 20% de genes anotados.

Figura 23. Workflow consolidado do pipeline de re-anotação genômica.

Sintaxe e semântica estão representadas em **A** - retângulos com bordas arredondadas representam início/fim do pipeline; em **B** – losango entrada de dados; **C** – retângulos processamento de dados; e **D** retângulos de base curva representam a saída de informações. **Genoma A** – hipotético composto por N contigs é utilizado como exemplo. Ao final do processamento um único arquivo que corresponde ao genoma anotado. Scripts escritos em linguagem de programação *perl*.



5.12 Sequenciamento em larga escala do transcrito de *P. brasiliensis*, isolados Pb339 e YRT

Sequenciaram-se pela metodologia de sequenciamento profundo RNASeq (*deep sequencing*), 5 amostras originadas cada uma de 3 experimentos independentes (triplicata biológica) em réplica técnica, somando-se um total de 15 bibliotecas de cDNA (Tabela 13). Refletindo o sequenciamento das duas extremidades de cada fragmento, foram obtidos 539,3 milhões de leituras curtas (*short reads* PE 2x100) com 100 pb de tamanho, correspondendo a 53,9 bilhões de pares de bases sequenciadas. O número de leituras com valor de $Q \geq 25$ foi de 507,6 milhões (94% das *reads*) de leituras pareadas (Tabela 13). O algoritmo *Trimomatic* foi empregado para aparar os adaptadores do sequenciamento, e como referência, um mapa de sequências de adaptadores PE fornecido pelo fabricante Illumina foi utilizado. Realizaram-se as análises de qualidade por amostragem, com o auxílio do software PrinSeq. O conteúdo percentual médio de GC foi de 46,6% apresentando uma distribuição normal entre todas as amostras, indicando ausência de sequências interferentes ou artefatos. Os dados brutos referentes a todas as análises realizadas nesse trabalho estão disponíveis no DVD Apêndice ao documento e a lista dos arquivos está contida no Apêndice VIII desse documento.

1

¹ http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/GenomesIndex.html

Tabela 11. Estatística do sequenciamento RNASeq e da montagem do transcriptoma do isolado YRT e do isolado Pb339.

Id da sequência	Id da amostra	Condições de crescimento			# de leituras mapeadas*	# de genes expressos
		# de dias de crescimento	temperatura (oC)	morfologia		
B339_5D_A	PbB339_L	5	37	L	27,416,670	7,989
B339_5D_B		5	37	L	23,470,334	7,913
B339_5D_C		5	37	L	21,186,156	7,865
B339_15D_A	PbB339_M	15	TA	M	18,909,632	7,985
B339_15D_B		15	TA	M	19,371,350	7,992
B339_15D_C		15	TA	M	17,296,658	7,964
YRT_37_5D_A	YRT_37_5D	5	37	L	20,571,618	8,068
YRT_37_5D_B		5	37	L	18,732,684	8,107
YRT_37_5D_C		5	37	L	41,442,704	8,111
YRT_25_5D_A	YRT_TA_5D	5	TA	L	20,714,118	8,055
YRT_25_5D_B		5	TA	L	19,135,818	8,026
YRT_25_5D_C		5	TA	L	19,676,390	8,019
YRT_25_15D_A	YRT_L15_TA	15	TA	L	16,873,910	8,016
YRT_25_15D_B		15	TA	L	18,120,362	8,024
YRT_25_15D_C		15	TA	L	16,822,146	8,032

* R1 and R2 paired-end reads

Id = Identificador

= número

L = Levedura

M = Micélio

D5 = Levedura com 5 dias de crescimento

D15 = Levedura com 15 dias de crescimento

M15 = Micélio com 15 dias de crescimento

37 = 37 graus Célsius

TA = Temperatura ambiente

5.13 Montagem por referência do transcrito do isolado Pb339 e do isolado YRT de *P. brasiliensis*

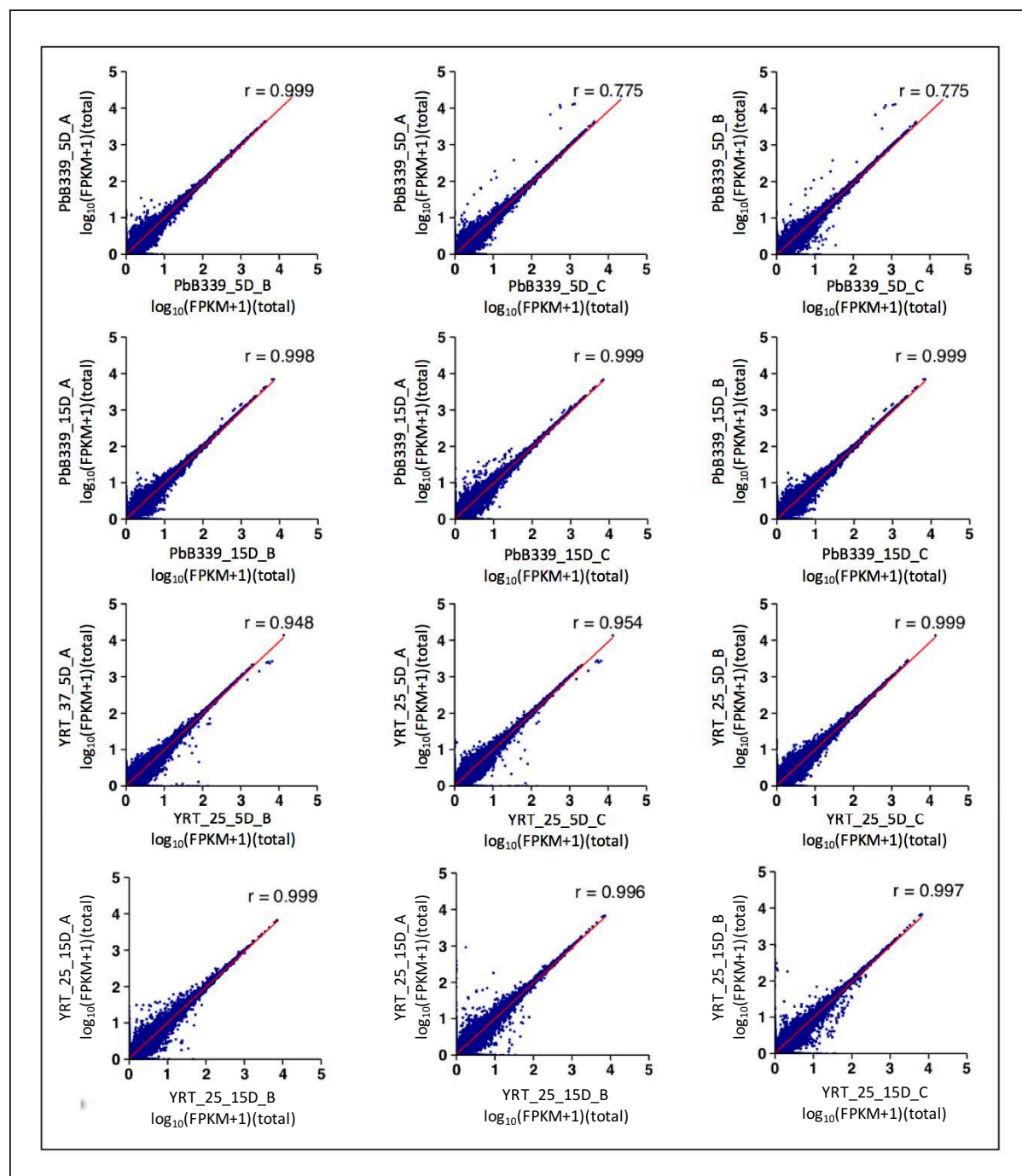
O mapeamento das leituras com valor $Q \geq 25$ foi realizado tomando como referência o genoma de *P. brasiliensis*, isolado Pb18v2. O algoritmo *Bowtie2*, implementado no pacote *Trinity*, foi utilizado para mapear as leituras das amostras YRT e Pb339 contra as sequências codificantes (CDS) dos genes de Pb18. Como resultado, mapearam-se um total de 319,7 milhões de fragmentos e o resultado pormenorizado para cada amostra pode ser visto na Tabela 14. Estimou-se a abundância dos transcritos pelo algoritmo RSEM e o resultado gerado (*output*) foi uma matriz (*TMM-normalized FPKM*) com valores de FPKM (fragmentos por quilobase de transcrito por milhão de leituras mapeadas) normalizados para cada transcrito. Essa matriz serviu como arquivo de entrada (*input*) para o algoritmo *edgeR* identificar os transcritos diferencialmente expressos. Todos os algoritmos utilizados nesse ensaio foram implementados juntamente com a instalação local do pacote *Trinity* (versão r2013-2-25).

Considerando um total de 8390 genes identificados em Pb18, as leituras de cada amostra mapearam, em média, para 8011 genes.

Para determinar a correlação entre as amostras, os valores de FPKM foram transformados na escala \log_{10} (logaritmo na base 10) e o coeficiente de correlação de Pearson (CCP) foi calculado. As réplicas biológicas apresentaram-se altamente correlacionadas, com o valores positivos de $0,78 \leq r \leq 0,99$ (figura 24). Análises do Componente Principal foram também realizadas e os resultados também podem ser consultados no Apêndice VII desse trabalho.

Figura 24. Comparações dos valores de FPKM dos transcritos entre as réplicas biológicas do isolado Pb339 e do isolado YRT, nas diferentes condições experimentais.

Para atribuir pesos equilibrados aos genes com baixos níveis de expressão, somou-se +1 ao valor de FPKM de cada gene e em seguida transformaram-se os valores em \log_{10} ($\log_{10}(\text{FPKM}+1)$). Os eixos X e Y representam a comparação par a par entre réplicas biológicas de cada amostra. O valor r representa o coeficiente de correlação de Pearson (CCP).



5.14 Análises do perfil transcricional dos isolados YRT e Pb339 em diferentes condições experimentais

A análise do perfil transcricional das 5 amostras de *P. brasiliensis* sob diferentes condições experimentais, foi realizada pelo software edgeR (*Empirical Analysis of Digital Gene Expression Data in R*) (Robinson *et al.*, 2010). As tabelas contendo os níveis de expressão de cada gene nas diferentes amostras e a anotação funcional podem ser consultadas no Apêndice VIII (6-TabSuplementar-Raw_data_valores_FPKM_genes_diff_exp_annot_func, 7-TabSuplementar-Genes-diff_expressos.xlsx, 9-ortologos).

5.14.1 Análise do perfil de expressão gênica das fases estágio-específicas L e M do isolado Pb339 de *P. brasiliensis*

Com o objetivo de obter o painel global do perfil de expressão gênica das duas fases morfológicas, micélio e levedura, de *P. brasiliensis* os genes diferencialmente expressos foram identificados dentro do critério de $p\text{-valor} < 1e^{-3}$ e $\log_2FC \geq 2$. Nossos resultados mostram uma clara distinção dos padrões de expressão genica em ambas as fases (Figura 25)

Um total de 1047 genes (12%) mostraram-se diferencialmente expressos entre as duas fases, compreendendo 247 (23,6%) genes na fase L e 800 (76,4%) na a fase M. Anotaram-se funcionalmente 139/247 (53,3%) e 444/800 (56,0%) genes regulados positivamente nas fases L e M, respectivamente, contendo pelo menos 1 domínio Pfam podendo estar associado ou não a anotação da base de dados *swissprot*, aos termos anotadores do Gene Ontology (GO), Kegg EC number e *pathways*, peptídeos sinal (signalP3 e P4) e domínios de transmembrana (TmHMM). Dessas análises 364 genes (34,8%) foram identificados como hipotéticos, com função desconhecida. Genes sistematicamente descritos na literatura como diferencialmente expressos na fase L, como os genes antígeno imunodominante gp43, ags1 (alpha-1,3-glucan *synthase*), o gene que codifica a proteína p27 kda foram identificados. Identificou-se o potencial fator de transcrição contendo o domínio ryp2 (família Velvet fator - PF00172.13), ortólogo de *H. capsulatum* e *B. dermatitidis*.

O gene 4-HPPD da família de proteínas dioxigenase (TIGR01263) contendo domínios de resistência ao fármaco Bleoycim (PF13669.1, PF12681.2, PF00903.20) apresentou-se regulado positivamente. Os genes associados aos processos biológicos de estresse oxidativo (*oxidation reduction* GO:0055114) e ubiquitinol-citocromo-c-redutase (GO:0008121, EC:1.10.2.2) foram destacados com enriquecimento significativo (q-valor<0.05) (Tabela 14). O primeiro compreende 27 genes incluindo Catalase B (CATB), *Cu Zu superoxide dismutase* (SOD1 e SOD3), *zinc superoxide dismutase* (SODC) (PF00080.15) and *flavin oxidoreductase* (PF00724.15), ortólogos aos fungos *B. demartitidis* and *H. capsulatum* e o segundo envolve 5 genes da via *ubiquitinol-citochrome reductase* (EC:1.10.2.2), (Tabela 12). Vale a pena ressaltar que vários genes envolvidos na degradação de lipídeos da via beta-oxidativa foram identificados, dentre eles 1 gene que codifica a enzima *enoyl-coA hydratase*, 2 genes para *acyl-coA dehydrogenase*, 1 gene para *3-hydroxyisobutyryl-coA dehydrogenase*, 1 gene para uma subunidade ATP syntase que se mostraram com regulação positiva. O gene ERG4/ERG2 (PF01222.12) da família de proteínas envolvidas na biossíntese de ergosterol (*7-dehydrocholesterol reductase*, K00213, EC:1.3.1.21) apresentou superexpressão (logFC>4) na levedura. Além desses, genes codificadores de enzimas contendo o domínio *Aldo keto reductase* (PF00248.16) envolvidas no metabolismo de ácido linoleico (ko00591) e glicerolipídeos (ko00561) também foram encontradas como reguladas positivamente (Tabela Supplem). Adicionalmente, o gene *Alcohol dehydrogenase GroES-like* (ADH_N - PF08240.7) também envolvido na síntese de glicerolipídeos (ko00561) apresentou-se induzido (Tabela 13, Apêndice VIII, 8-blast2go).

Figura 25. Perfil e do isolado Pb339 nas formas L e M de *P. brasiliensis*.

Considerou-se para essa análise a média dos valores de FPKM normalizados de cada amostra. A variação da cor azul na escala de cores, da mais forte a mais fraca, representa a regulação negativa da expressão gênica e a variação da cor vermelha, da mais fraca a mais forte, representa a regulação positiva da expressão gênica; à esquerda, a escala de 6 cores na vertical, representa os clusters gênicos das amostras.

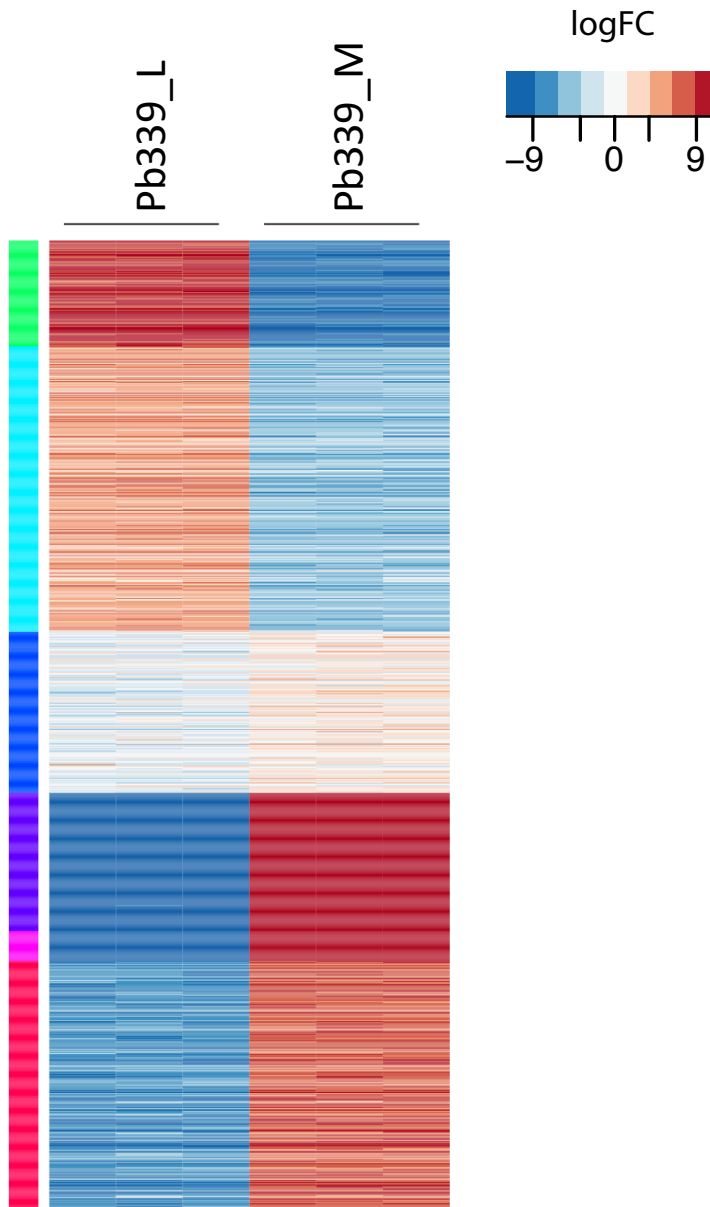


Tabela 12. Termos GO enriquecidos ou empobrecidos nos isolados Pb339 e YRT *P. brasiliensis* em diferentes condições experimentais

Termos GO	enriquecidos*	empobrecidos*	q-value
gene expression [GO:0010467]		YRT_5D_37° C	3.08E-02
macromolecular complex [GO:0032991]		YRT_5D_37° C	8.11E-03
intracellular membrane-bounded organelle [GO:0043231]		YRT_5D_37° C	3.68E-02
cellular biosynthetic process [GO:0044249]		YRT_5D_37° C	2.99E-03
cellular macromolecule metabolic process [GO:0044260]		YRT_5D_37° C	2.10E-02
macromolecular complex [GO:0032991]		YRT_5D_TA	1.04E-02
cellular macromolecule metabolic process [GO:0044260]		YRT_5D_TA	1.17E-02
intracellular part [GO:0044424]		YRT_5D_TA	8.23E-03
cofactor binding [GO:0048037]	YRT_5D_TA		1.43E-02
nucleic acid binding [GO:0003676]		YRT_15D_TA	4.55E-02
protein kinase activity [GO:0004672]	YRT_15D_TA		1.56E-02
gene expression [GO:0010467]		YRT_15D_TA	1.06E-03
oxidoreductase activity [GO:0016491]	YRT_15D_TA		2.79E-02
cellular macromolecule biosynthetic process [GO:0034645]		YRT_15D_TA	2.79E-02
intracellular membrane-bounded organelle [GO:0043231]		YRT_15D_TA	3.88E-03
protein complex [GO:0043234]		YRT_15D_TA	4.55E-02
cytoplasmic part [GO:0044444]		YRT_15D_TA	1.22E-02
intracellular organelle part [GO:0044446]		YRT_15D_TA	2.79E-02
ubiquinol-cytochrome-c reductase activity [GO:0008121]	PbB339_L		4.26E-03
oxidation reduction [GO:0055114]	PbB339_L		1.06E-03
oxidation reduction [GO:0055114]	PbB339_M		2.78E-02
transporter activity [GO:0005215]	PbB339_M		3.27E-02
transmembrane transport [GO:0055085]	PbB339_M		1.91E-03
electron carrier activity [GO:0009055]	PbB339_M		3.00E-02
monooxygenase activity [GO:0004497]	PbB339_M		3.33E-04
carbon-sulfur lyase activity [GO:0016846]	PbB339_M		4.13E-02

GO, gene ontology

* termos significativamente enriquecidos ou empobrecidos na linhagem YRT e no isolado PbB339 de *P. brasiliensis* em diferentes condições experimentais ($q < 0.05$, teste exato de Fisher).

M = Micélio

L = Levedura

YRT = Yeast at Room Temperature

5D = 5 dias de crescimento

15D = 15 dias de crescimento

TA = Temperatura ambiente

°C = graus Celsius

Tabela 13. Termos GO enriquecidos do transcrito das formas L do isolado Pb339 de *P. brasiliensis*, com 5 dias de crescimento a 37°C

Locus Pb18	Produto	Pfam	KeggEC
ubiquinol-cytochrome-c reductase activity			
PADG_03699	hypothetical protein	PF05365.7 UCR_UQCRX_QCR9[Ubiquinol-cytochrome C reductase, UQCRX/QCR9 like]	EC:1.10.2.2[Ubiquinol--cytochrome-c reductase.]
PADG_01727	hypothetical protein	PF02320.11 UCR_hinge[Ubiquinol-cytochrome C reductase hinge protein]	EC:1.10.2.2[Ubiquinol--cytochrome-c reductase.]
PADG_05436	cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	PF02921.9 UCR_TM[Ubiquinol cytochrome reductase transmembrane region];PF00355.21 Rieske[Rieske [2Fe-2S] domain];TIGR01416[Rieske_proteo: ubiquinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit]	EC:1.10.2.2[Ubiquinol--cytochrome-c reductase.]
PADG_04613	hypothetical protein	PF02939.11 UcrQ[UcrQ family]	EC:1.10.2.2[Ubiquinol--cytochrome-c reductase.]
PADG_08394	hypothetical protein	PF05193.16 Peptidase_M16_C[Peptidase M16 inactive domain];PF00675.15 Peptidase_M16[Insulinase (Peptidase family M16)]	EC:1.10.2.2[Ubiquinol--cytochrome-c reductase.]
oxidation reduction			
PADG_06765	hypothetical protein	PF00107.21 ADH_zinc_N[Zinc-binding dehydrogenase];PF13602.1 ADH_zinc_N_2[Zinc-binding dehydrogenase]	EC:1.3.1.74[2-alkenal redu
PADG_08719	hypothetical protein	PF08022.7 FAD_binding_8[FAD-binding domain];PF08030.7 NAD_binding_6[Ferric reductase NAD binding domain];PF01794.14 Ferric_reduct[Ferric reductase like transmembrane component]	.
PADG_00225	hypothetical protein	PF00199.14 Catalase[Catalase];PF06628.7 Catalase-rel[Catalase-related immune-responsive]	EC:1.11.1.6[catalase]
PADG_07748	hypothetical protein	PF00106.20 adh_short[short chain dehydrogenase]	.
PADG_02842	hypothetical protein	PF00080.15 Sod_Cu[Copper/zinc superoxide dismutase (SODC)]	.
PADG_03268	hypothetical protein	PF00248.16 Aldo_ket_red[Aldo/keto reductase family]	.

Continuação da Tabela 15

PADG_05756	hypothetical protein	PF00070.22 Pyr_redox[Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase];PF07992.9 Pyr_redox_2[Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase]	.
PADG_07435	hypothetical protein	PF13561.1 adh_short_C2[Enoyl-(Acyl carrier protein) reductase];PF08659.5 KR[KR domain];PF00106.20 adh_short[short chain dehydrogenase]	EC:1.-.-.-[Oxidoreductases.]
PADG_04655	hypothetical protein	PF08659.5 KR[KR domain];PF00106.20 adh_short[short chain dehydrogenase]	.
PADG_01228	hypothetical protein	PF02737.13 3HCDH_N[3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, NAD binding domain];PF00725.17 3HCDH[3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, C-terminal domain];PF03446.10 NAD_binding_2[NAD binding domain of 6-phosphogluconate dehydrogenase]	EC:1.1.1.157[3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase.]
PADG_03514	hypothetical protein	PF00676.15 E1_dh[Dehydrogenase E1 component]	EC:1.2.4.4[3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase (2-methylpropanoyl-transferring).]
PADG_08468	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	PF13669.1 Glyoxalase_4[Glyoxalase/Bleomycin resistance protein/Dioxygenase superfamily];PF12681.2 Glyoxalase_2[Glyoxalase-like domain];PF00903.20 Glyoxalase[Glyoxalase/Bleomycin resistance protein/Dioxygenase superfamily];TIGR01263[4HPPD: 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase]	EC:1.13.11.27[4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase.]
PADG_02178	hypothetical protein	PF00248.16 Aldo_ket_red[Aldo/keto reductase family]	.
PADG_07369	hypothetical protein	PF08028.6 Acyl-CoA_dh_2[Acyl-CoA dehydrogenase, C-terminal domain];PF02770.14 Acyl-CoA_dh_M[Acyl-CoA dehydrogenase, middle domain];PF02771.11 Acyl-CoA_dh_N[Acyl-CoA dehydrogenase, N-terminal domain];PF00441.19 Acyl-CoA_dh_1[Acyl-CoA dehydrogenase, C-terminal domain];PF13454.1 NAD_binding_9[FAD-NAD(P)-binding];PF13450.1 NAD_binding_8[NAD(P)-binding Rossmann-like domain];PF00743.14 FMO-like[Flavin-binding monooxygenase-like];PF13434.1 K_oxygenase[L-lysine 6-monooxygenase (NADPH-requiring)];PF13738.1 Pyr_redox_3[Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase];PF07992.9 Pyr_redox_2[Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase]	EC:1.3.8.4[Isovaleryl-CoA dehydrogenase.]
PADG_07540	hypothetical protein	PF13454.1 NAD_binding_9[FAD-NAD(P)-binding];PF13450.1 NAD_binding_8[NAD(P)-binding Rossmann-like domain];PF00743.14 FMO-like[Flavin-binding monooxygenase-like];PF13434.1 K_oxygenase[L-lysine 6-monooxygenase (NADPH-requiring)];PF13738.1 Pyr_redox_3[Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase];PF07992.9 Pyr_redox_2[Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase]	.

Continuação da Tabela 15

PADG_07017	hypothetical protein	PF07992.9 Pyr_redox_2[Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase]	EC:1.18.1.2[Ferredoxin--NADP reductase.]
PADG_01486	hypothetical protein	PF13561.1 adh_short_C2[Enoyl-(Acyl carrier protein) reductase];PF08659.5 KR[KR domain];PF00106.20 adh_short[short chain dehydrogenase]	EC:1.1.1.69[Gluconate 5-dehydrogenase.]
PADG_04613	hypothetical protein	PF02939.11 UcrQ[UcrQ family]	.
PADG_03163	cytochrome c peroxidase, mitochondrial	PF00141.18 peroxidase[Peroxidase]	EC:1.11.1.5[Cytochrome-c peroxidase.]
PADG_04332	hypothetical protein	PF00107.21 ADH_zinc_N[Zinc-binding dehydrogenase];PF08240.7 ADH_N[Alcohol dehydrogenase GroES-like domain];PF13602.1 ADH_zinc_N_2[Zinc-binding dehydrogenase]	.
PADG_08394	hypothetical protein	PF05193.16 Peptidase_M16_C[Peptidase M16 inactive domain];PF00675.15 Peptidase_M16[Insulinase (Peptidase family M16)]	.
PADG_03786	hypothetical protein	PF01257.14 2Fe-2S_thioredx[Thioredoxin-like [2Fe-2S] ferredoxin];TIGR01958[nuoE_fam: NADH-quinone oxidoreductase, E subunit]	EC:1.6.99.3[NADH dehydrogenase.]; EC:1.6.5.3[NADH:ubiquinone]
PADG_06196	hypothetical protein	PF00724.15 Oxidored_FMN[NADH:flavin oxidoreductase / NADH oxidase family]	.
PADG_01557	ubiquinone biosynthesis monooxygenase COQ6	TIGR01988[Ubi-OHases: ubiquinone biosynthesis hydroxylase, UbiH/UbiF/VisC/COQ6 family];PF01494.14 FAD_binding_3[FAD binding domain]	.
PADG_02050	hypothetical protein	PF13460.1 NAD_binding_10[NADH(P)-binding];PF01370.16 Epimerase[NAD dependent epimerase/dehydratase family]	.
PADG_00221	hypothetical protein	PF08659.5 KR[KR domain];PF13561.1 adh_short_C2[Enoyl-(Acyl carrier protein) reductase];PF00106.20 adh_short[short chain dehydrogenase]	.
PADG_07606	hypothetical protein	PF00248.16 Aldo_ket_red[Aldo/keto reductase family]	EC:1.1.-.-[Acting on the CH-C group of donors.]

Continuação da Tabela 15

PADG_07017	hypothetical protein	PF07992.9 Pyr_redox_2[Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase]	EC:1.18.1.2[Ferredoxin--NADH reductase.]
PADG_01486	hypothetical protein	PF13561.1 adh_short_C2[Enoyl-(Acyl carrier protein) reductase];PF08659.5 KR[KR domain];PF00106.20 adh_short[short chain dehydrogenase]	EC:1.1.1.69[Gluconate 5-dehydrogenase.]
PADG_04613	hypothetical protein	PF02939.11 UcrQ[UcrQ family]	.
PADG_03163	cytochrome c peroxidase, mitochondrial	PF00141.18 peroxidase[Peroxidase]	EC:1.11.1.5[Cytochrome-c peroxidase.]
PADG_04332	hypothetical protein	PF00107.21 ADH_zinc_N[Zinc-binding dehydrogenase];PF08240.7 ADH_N[Alcohol dehydrogenase GroES-like domain];PF13602.1 ADH_zinc_N_2[Zinc-binding dehydrogenase]	.
PADG_08394	hypothetical protein	PF05193.16 Peptidase_M16_C[Peptidase M16 inactive domain];PF00675.15 Peptidase_M16[Insulinase (Peptidase family M16)]	.
PADG_03786	hypothetical protein	PF01257.14 2Fe-2S_thioredx[Thioredoxin-like [2Fe-2S] ferredoxin];TIGR01958[nuoE_fam: NADH-quinone oxidoreductase, E subunit]	EC:1.6.99.3[NADH dehydrogenase.]; EC:1.6.5.3[NADH:ubiquinone]
PADG_06196	hypothetical protein	PF00724.15 Oxidored_FMN[NADH:flavin oxidoreductase / NADH oxidase family]	.
PADG_01557	ubiquinone biosynthesis monooxygenase COQ6	TIGR01988[Ubi-OHases: ubiquinone biosynthesis hydroxylase, UbiH/UbiF/VisC/COQ6 family];PF01494.14 FAD_binding_3[FAD binding domain]	.
PADG_02050	hypothetical protein	PF13460.1 NAD_binding_10[NADH(P)-binding];PF01370.16 Epimerase[NAD dependent epimerase/dehydratase family]	.
PADG_00221	hypothetical protein	PF08659.5 KR[KR domain];PF13561.1 adh_short_C2[Enoyl-(Acyl carrier protein) reductase];PF00106.20 adh_short[short chain dehydrogenase]	.
PADG_07606	hypothetical protein	PF00248.16 Aldo_ket_red[Aldo/keto reductase family]	EC:1.1.-.-[Acting on the CH-C group of donors.]

Continuação da Tabela 15

PADG_06494	dihydrolipoyl dehydrogenase	PF12831.2 FAD_oxidored[FAD dependent oxidoreductase];PF02852.17 Pyr_redox_dim[Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase, dimerisation domain];PF13450.1 NAD_binding_8[NAD(P)-binding Rossmann-like domain];PF00070.22 Pyr_redox[Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase];TIGR01350[lipoamide_DH: dihydrolipoyl dehydrogenase];PF01946.12 Thi4[Thi4 family];PF13738.1 Pyr_redox_3[Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase];PF07992.9 Pyr_redox_2[Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase];PF01134.17 GIDA[Glucose inhibited division protein A];PF00890.19 FAD_binding_2[FAD binding domain]	EC:1.8.1.4[Dihydrolipoyl dehydrogenase.]
------------	--------------------------------	---	---

Com relação aos genes diferencialmente expressos na fase micelial, o gene para a hidrofobina (Pbhyd1 hydrophobin 1), específico da fase filamentosa desse fungo, apresentou-se superexpresso ($\log_{2}FC > 8$). O gene codificador para a glutamino sintase (Glutamine synthetase-gln1), had32 e badh, também mostraram-se induzidos nessa fase. Um conjunto de 7 genes superexpressos ($3 > \log_{2}FC < 8$) apresentando o domínio catalítico GroES-like ADH_N (ADH_N, Alcohol dehydrogenase GroES-like domain - PF08240.7), presentes na via metabólica alcohol dehydrogenase (EC:1.1.1.1). A análise de enriquecimento GO (Tabela 12) apresentou funções biológicas enriquecidas significativamente (q-value < 0.05) nas funções de oxidation reduction, transporter activity e transmembrane transporter, monooxygenase activity e carbon-sulfur lyase activity (Tabela GO). Vale a pena destacar que na função carbon-sulfur lyase activity. Adicionalmente os genes contendo os domínios conservados cytochrome P450 (PF00067.17) e genes envolvidos nos processos de transporte celular (PF00083.19, PF07690.11, PF08241.7, PF12847.2, PF13489.1, PF13847.1) também apresentaram regulação positiva e estão enriquecidos significativamente (q-value < 0.05) (Tabela 14).

Tabela 14. Termos GO enriquecidos do transcrito da forma M do isolado Pb339 de *P. brasiliensis*.

Locus Pb18	Produto	Pfam	KeggEC
Oxidation reduction (GO:0055114)			
PADG_04516	NADP-specific glutamate dehydrogenase	PF02812.13 ELFV_dehydrog_N[Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase, dimerisation domain];PF00208.16 ELFV_dehydrog[Glutamate/Leucine/Phenylalanine/Valine dehydrogenase]	EC:1.4.1.4[Glutamate dehydrogenase (NADP(+)).]
PADG_06740	hypothetical protein	PF00171.17 Aldedh[Aldehyde dehydrogenase family]	EC:1.2.1.3[Aldehyde dehydrogenase (NAD(+)).]
PADG_04329	hypothetical protein	PF01231.13 IDO[Indoleamine 2,3-dioxygenase]	EC:1.13.11.52[Indoleamine 2,3-dioxygenase.]
PADG_01716	hypothetical protein	PF00107.21 ADH_zinc_N[Zinc-binding dehydrogenase];PF08240.7 ADH_N[Alcohol dehydrogenase GroES-like domain];PF13602.1 ADH_zinc_N_2[Zinc-binding dehydrogenase]	.
PADG_03395	sulfite reductase (NADPH) hemoprotein, beta-component	PF01855.14 POR_N[Pyruvate flavodoxin/ferredoxin oxidoreductase, thiamine diP-bdg];PF01077.17 NIR_SIR[Nitrite and sulphite reductase 4Fe-4S domain];PF03460.12 NIR_SIR_ferr[Nitrite/Sulfite reductase ferredoxin-like half domain];PF00258.20 Flavodoxin_1[Flavodoxin]	EC:1.8.1.2[Sulfite reductase (NADPH).]
PADG_00229	hypothetical protein	PF07976.7 Phe_hydrox_dim[Phenol hydroxylase, C-terminal dimerisation domain];PF01494.14 FAD_binding_3[FAD binding domain]	.
PADG_05994	hypothetical protein	PF07731.9 Cu-oxidase_2[Multicopper oxidase];PF07732.10 Cu-oxidase_3[Multicopper oxidase];PF00394.17 Cu-oxidase[Multicopper oxidase]	.
PADG_02492	hypothetical protein	PF08240.7 ADH_N[Alcohol dehydrogenase GroES-like domain]	.
PADG_11115	hypothetical protein	PF12847.2 Methyltransf_18[Methyltransferase domain];PF00109.21 ketoacyl-synt[Beta-ketoacyl synthase, N-terminal domain];PF08242.7 Methyltransf_12[Methyltransferase domain];PF08241.7 Methyltransf_11[Methyltransferase domain];PF00698.16 Acyl_transf_1[Acyl transferase domain];PF13489.1 Methyltransf_23[Methyltransferase domain];PF00107.21 ADH_zinc_N[Zinc-binding dehydrogenase];PF08240.7 ADH_N[Alcohol dehydrogenase GroES-like domain];PF08659.5 KR[KR domain];PF13847.1 Methyltransf_31[Methyltransferase domain];PF00106.20 adh_short[short chain dehydrogenase];PF13602.1 ADH_zinc_N_2[Zinc-binding dehydrogenase];PF14765.1 PS-DH[Polyketide synthase dehydratase];PF02801.17 Ketoacyl-synt_C[Beta-ketoacyl synthase, C-terminal domain]	.

Continuação da Tabela 14

PADG_07263	hypothetical protein	PF01179.15 Cu_amine_oxid[Copper amine oxidase, enzyme domain]	EC:1.4.3.21[Primary-amine oxidase.]
PADG_05031	hypothetical protein	PF00107.21 ADH_zinc_N[Zinc-binding dehydrogenase];PF08240.7 ADH_N[Alcohol dehydrogenase GroES-like domain]	.
PADG_02838	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450]	.
PADG_06709	hypothetical protein	PF00107.21 ADH_zinc_N[Zinc-binding dehydrogenase];PF13602.1 ADH_zinc_N_2[Zinc-binding dehydrogenase]	.
PADG_11807	hypothetical protein	PF08030.7 NAD_binding_6[Ferric reductase NAD binding domain];PF08022.7 FAD_binding_8[FAD-binding domain];PF01794.14 Ferric_reduct[Ferric reductase like transmembrane component]	.
PADG_02837	hypothetical protein	PF08240.7 ADH_N[Alcohol dehydrogenase GroES-like domain]	.
PADG_02901	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	TIGR01236[D1pyr5carbox1: 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase];PF00171.17 Aldehd[Aldehyde dehydrogenase family]	EC:1.5.1.12[1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase.]
PADG_06026	hypothetical protein	PF08022.7 FAD_binding_8[FAD-binding domain];PF08030.7 NAD_binding_6[Ferric reductase NAD binding domain];PF01794.14 Ferric_reduct[Ferric reductase like transmembrane component]	.
PADG_06221	formate dehydrogenase	PF00389.25 2-Hacid_dh[D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase, catalytic domain];PF02826.14 2-Hacid_dh_C[D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase, NAD binding domain]	EC:1.2.1.2[Formate dehydrogenase.]
PADG_08123	hypothetical protein	PF13561.1 adh_short_C2[Enoyl-(Acyl carrier protein) reductase];PF00106.20 adh_short[short chain dehydrogenase]	.
PADG_01249	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450]	.
PADG_05961	hypothetical protein	PF00743.14 FMO-like[Flavin-binding monooxygenase-like];PF13434.1 K_oxygenase[L-lysine 6-monooxygenase (NADPH-requiring)];PF13738.1 Pyr_redox_3[Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase]	.
PADG_05488	hypothetical protein	PF01494.14 FAD_binding_3[FAD binding domain]	.
PADG_07429	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450];PF03098.10 An_peroxidase[Animal haem peroxidase]	.
PADG_05655	hypothetical protein	PF14226.1 DIOX_N[non-haem dioxygenase in morphine synthesis N-terminal];PF03171.15 2OG-FeII_Oxy[2OG-Fe(II) oxygenase superfamily]	.
PADG_08007	hypothetical protein	PF14833.1 NAD_binding_11[NAD-binding of NADP-dependent 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase];PF03446.10 NAD_binding_2[NAD binding domain of 6-phosphogluconate dehydrogenase]	.
PADG_04703	hypothetical protein	PF13450.1 NAD_binding_8[NAD(P)-binding Rossmann-like domain];PF00743.14 FMO-like[Flavin-binding monooxygenase-like];PF13738.1 Pyr_redox_3[Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase]	EC:1.14.13.-[With NADH or NADPH as one donor, and incorporation of one atom of oxygen.]
PADG_07254	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450]	.
PADG_08461	hypothetical protein	PF01494.14 FAD_binding_3[FAD binding domain]	.

Continuação da Tabela 14

PADG_04698	hypothetical protein	PF02900.13 LigB[Catalytic LigB subunit of aromatic ring-opening dioxygenase]	.
PADG_03616	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450]	.
PADG_03344	hypothetical protein	PF00171.17 Aldedh[Aldehyde dehydrogenase family]	EC:1.2.1.24[Succinate-semialdehyde dehydrogenase (NAD(+)).]
PADG_05660	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450]	EC:1.7.1.14[Nitric oxide reductase (NAD(P), nitrous oxide-forming).]
PADG_06722	hypothetical protein	PF00107.21 ADH_zinc_N[Zinc-binding dehydrogenase];PF08240.7 ADH_N[Alcohol dehydrogenase GroES-like domain]	.
PADG_02104	hypothetical protein	PF13450.1 NAD_binding_8[NAD(P)-binding Rossmann-like domain];PF13454.1 NAD_binding_9[FAD-NAD(P)-binding];PF00743.14 FMO-like[Flavin-binding monooxygenase-like];PF13738.1 Pyr_redox_3[Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase];PF07992.9 Pyr_redox_2[Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase]	.
PADG_03314	glycolate oxidase, subunit GlcD	PF02913.14 FAD-oxidase_C[FAD linked oxidases, C-terminal domain];PF01565.18 FAD_binding_4[FAD binding domain]	EC:1.1.2.4[D-lactate dehydrogenase (cytochrome).]
PADG_07991	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450]	.
PADG_02590	hypothetical protein	PF00743.14 FMO-like[Flavin-binding monooxygenase-like];PF13434.1 K_oxygenase[L-lysine 6-monooxygenase (NADPH-requiring)];PF13738.1 Pyr_redox_3[Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase];PF07992.9 Pyr_redox_2[Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase]	.
PADG_11456	hypothetical protein	PF01179.15 Cu_amine_oxid[Copper amine oxidase, enzyme domain]	.
PADG_00088	nitrite reductase, copper-containing	PF07732.10 Cu-oxidase_3[Multicopper oxidase]	EC:1.7.99.-[With other acceptors.]
PADG_00403	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450]	.
PADG_03774	hypothetical protein	PF02668.11 TauD[Taurine catabolism dioxygenase TauD, TfdA family]	.
PADG_03128	hypothetical protein	PF04116.8 FA_hydroxylase[Fatty acid hydroxylase superfamily]	.
PADG_07391	hypothetical protein	PF07976.7 Phe_hydrox_dim[Phenol hydroxylase, C-terminal dimerisation domain];PF01494.14 FAD_binding_3[FAD binding domain]	.
PADG_01212	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450]	.
PADG_00813	hypothetical protein	PF08022.7 FAD_binding_8[FAD-binding domain];PF08030.7 NAD_binding_6[Ferric reductase NAD binding domain];PF01794.14 Ferric_reduct[Ferric reductase like transmembrane component]	.
PADG_12174	2-deoxy-D-gluconate 3-dehydrogenase	PF08659.5 KR[KR domain];PF13561.1 adh_short_C2[Enoyl-(Acyl carrier protein) reductase];PF00106.20 adh_short[short chain dehydrogenase]	EC:1.1.1.125[2-deoxy-D-gluconate 3 dehydrogenase.]
PADG_06725	hypothetical protein	PF00389.25 2-Hacid_dh[D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase, catalytic domain];PF02826.14 2-Hacid_dh_C[D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase, NAD binding domain]	.
PADG_01182	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450]	.

Continuação da Tabela 14

PADG_05120	hypothetical protein	PF02770.14 Acyl-CoA_dh_M[Acyl-CoA dehydrogenase, middle domain];PF01756.14 ACOX[Acyl-CoA oxidase];PF14749.1 Acyl-CoA_ox_N[Acyl-coenzyme A EC:1.3.3.6[Acyl-CoA oxidase.] oxidase N-terminal]	.
PADG_11457	hypothetical protein	PF02727.11 Cu_amine_oxidN2[Copper amine oxidase, N2 domain];PF01179.15 Cu_amine_oxid[Copper amine oxidase, enzyme domain]	.
PADG_05495	hypothetical protein	PF08659.5 KR[KR domain];PF00106.20 adh_short[short chain dehydrogenase]	.
PADG_03226	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450]	.
PADG_07982	hypothetical protein	PF13561.1 adh_short_C2[Enoyl-(Acyl carrier protein) reductase];PF08659.5 KR[KR domain];PF00106.20 adh_short[short chain dehydrogenase]	.
PADG_06247	hypothetical protein	PF04321.12 RmlD_sub_bind[RmlD substrate binding domain];PF08659.5 KR[KR domain];PF00106.20 adh_short[short chain dehydrogenase];PF01370.16 Epimerase[NAD EC:1.-.--[Oxidoreductases.] dependent epimerase/dehydratase family]	.
PADG_02945	hypothetical protein	PF08028.6 Acyl-CoA_dh_2[Acyl-CoA dehydrogenase, C-terminal domain];PF02770.14 Acyl-CoA_dh_M[Acyl-CoA dehydrogenase, middle domain];PF02771.11 Acyl-CoA_dh_N[Acyl-CoA dehydrogenase, N-terminal domain];PF00441.19 Acyl-CoA_dh_1[Acyl-CoA dehydrogenase, C-terminal domain]	.
PADG_00213	hypothetical protein	PF02558.11 ApbA[Ketopantoate reductase PanE/ApbA];PF08546.6 ApbA_C[Ketopantoate reductase PanE/ApbA C terminal]	.
PADG_06006	hypothetical protein	PF13561.1 adh_short_C2[Enoyl-(Acyl carrier protein) reductase];PF08659.5 KR[KR domain];PF00106.20 adh_short[short chain dehydrogenase]	.
PADG_02018	hypothetical protein	PF08240.7 ADH_N[Alcohol dehydrogenase GroES-like domain]	.
PADG_07746	hypothetical protein	PF13450.1 NAD_binding_8[NAD(P)-binding Rossmann-like domain];PF00743.14 FMO-like[Flavin-binding monooxygenase-like];PF13434.1 K_oxygenase[L-lysine 6-monooxygenase (NADPH-requiring)];PF13738.1 Pyr_redox_3[Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase]	.

Continuação da Tabela 14

transporter activity (GO:0005215)		
PADG_06632	hypothetical protein	PF00854.16 PTR2[POT family]
PADG_00228	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily];PF00083.19 Sugar_tr[Sugar (and other) transporter]
PADG_05728	hypothetical protein	PF00854.16 PTR2[POT family]
PADG_03582	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily];PF06609.8 TRI12[Fungal trichothecene efflux pump (TRI12)];PF00083.19 Sugar_tr[Sugar (and other) transporter]
PADG_01537	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily];PF00083.19 Sugar_tr[Sugar (and other) transporter]
PADG_08186	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily];PF06609.8 TRI12[Fungal trichothecene efflux pump (TRI12)];PF00083.19 Sugar_tr[Sugar (and other) transporter]
PADG_03223	hypothetical protein	TIGR00801[ncs2: uracil-xanthine permease];PF00860.15 Xan_ur_permease[Permease family]
transmembrane transport (GO:0055085)		
PADG_02173	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily];TIGR00879[SP: MFS transporter, sugar porter (SP) family];PF00083.19 Sugar_tr[Sugar (and other) transporter]
PADG_00025	hypothetical protein	PF00153.22 Mito_carr[Mitochondrial carrier protein]
PADG_08196	hypothetical protein	PF01545.16 Cation_efflux[Cation efflux family];TIGR01297[CDF: cation diffusion facilitator family transporter]
PADG_01884	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily]
PADG_08141	hypothetical protein	PF00324.16 AA_permease[Amino acid permease];PF13520.1 AA_permease_2[Amino acid permease]
PADG_04935	hypothetical protein	PF02386.11 TrkH[Cation transport protein];TIGR00934[2a38euk: potassium uptake protein, Trk family]
PADG_03252	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily]
PADG_02786	hypothetical protein	PF00324.16 AA_permease[Amino acid permease];PF13520.1 AA_permease_2[Amino acid permease]
PADG_00506	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily]
PADG_06701	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily]
PADG_07197	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily];PF00083.19 Sugar_tr[Sugar (and other) transporter]
PADG_00347	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily]
PADG_08314	hypothetical protein	PF01544.13 CorA[CorA-like Mg ²⁺ transporter protein]
PADG_07631	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily];PF05977.8 MFS_3[Transmembrane secretion effector];PF00083.19 Sugar_tr[Sugar (and other) transporter]
PADG_03069	hypothetical protein	PF00005.22 ABC_tran[ABC transporter];PF00664.18 ABC_membrane[ABC transporter transmembrane region]

Continuação da Tabela 14

PADG_01539	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily];TIGR00879[SP: MFS transporter, sugar porter (SP) family];PF00083.19 Sugar_tr[Sugar (and other) transporter]	.
PADG_01490	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily];PF00083.19 Sugar_tr[Sugar (and other) transporter]	.
PADG_00570	hypothetical protein	PF00005.22 ABC_tran[ABC transporter];PF00664.18 ABC_membrane[ABC transporter transmembrane region]	.
PADG_05549	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily]	.
PADG_08544	hypothetical protein	TIGR00913[2A0310: amino acid permease (yeast)];PF00324.16 AA_permease[Amino acid permease];PF13520.1 AA_permease_2[Amino acid permease]	.
PADG_03944	hypothetical protein	PF13857.1 Ank_5[Ankyrin repeats (many copies)];PF13606.1 Ank_3[Ankyrin repeat];PF12796.2 Ank_2[Ankyrin repeats (3 copies)];PF13637.1 Ank_4[Ankyrin repeats (many copies)];PF00023.25 Ank[Ankyrin repeat]	.
PADG_04149	hypothetical protein	PF03169.10 OPT[OPT oligopeptide transporter protein];TIGR00728[OPT_sfam: oligopeptide transporter, OPT superfamily]	.
PADG_05446	calcium/proton exchanger	TIGR00846[caca2: calcium/proton exchanger];TIGR00378[cax: calcium/proton exchanger];PF01699.19 Na_Ca_ex[Sodium/calcium exchanger protein]	.
PADG_11589	hypothetical protein	.	.
PADG_05698	hypothetical protein	PF05631.9 DUF791[Protein of unknown function (DUF791)];PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily];TIGR00879[SP: MFS transporter, sugar porter (SP) family];PF00083.19 Sugar_tr[Sugar (and other) transporter]	.
PADG_05316	hypothetical protein	PF01544.13 CorA[CorA-like Mg ²⁺ transporter protein]	.
PADG_04887	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily];PF13347.1 MFS_2[MFS/sugar transport protein]	.
PADG_00709	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily];TIGR00879[SP: MFS transporter, sugar porter (SP) family];PF00083.19 Sugar_tr[Sugar (and other) transporter]	.
PADG_01211	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily];PF00083.19 Sugar_tr[Sugar (and other) transporter]	.
PADG_03479	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily]	.
PADG_02003	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily]	.
PADG_00712	hypothetical protein	PF02535.17 Zip[ZIP Zinc transporter]	.
PADG_00502	hypothetical protein	PF00083.19 Sugar_tr[Sugar (and other) transporter]	.
PADG_05630	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily];PF00083.19 Sugar_tr[Sugar (and other) transporter]	.
PADG_04037	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily];PF06609.8 TRI12[Fungal trichothecene efflux pump (TRI12)]	.
PADG_02138	hypothetical protein	PF01544.13 CorA[CorA-like Mg ²⁺ transporter protein]	.
PADG_04327	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily]	.
PADG_11576	hypothetical protein	.	.
PADG_00228	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily];PF00083.19 Sugar_tr[Sugar (and other) transporter]	.

Continuação da Tabela 14

PADG_03582	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily];PF06609.8 TRI12[Fungal trichothecene efflux pump (TRI12)];PF00083.19 Sugar_tr[Sugar (and other) transporter]	.
PADG_01537	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily];PF00083.19 Sugar_tr[Sugar (and other) transporter]	.
PADG_08186	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily];PF06609.8 TRI12[Fungal trichothecene efflux pump (TRI12)];PF00083.19 Sugar_tr[Sugar (and other) transporter]	.
PADG_03223	hypothetical protein	TIGR00801[ncs2: uracil-xanthine permease];PF00860.15 Xan_ur_permease[Permease family]	.
electron carrier activity (GO:0009055)			
PADG_02838	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450]	.
PADG_11807	hypothetical protein	PF08030.7 NAD_binding_6[Ferric reductase NAD binding domain];PF08022.7 FAD_binding_8[FAD-binding domain];PF01794.14 Ferric_reduct[Ferric reductase like transmembrane component]	.
PADG_06026	hypothetical protein	PF08022.7 FAD_binding_8[FAD-binding domain];PF08030.7 NAD_binding_6[Ferric reductase NAD binding domain];PF01794.14 Ferric_reduct[Ferric reductase like transmembrane component]	.
PADG_03901	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450]	.
PADG_01249	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450]	.
PADG_07429	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450];PF03098.10 An_peroxidase[Animal haem peroxidase]	.
PADG_07254	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450]	.
PADG_03616	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450]	.
PADG_05660	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450]	EC:1.7.1.14[Nitric oxide reductase (NAD(P), nitrous oxide-forming).]
PADG_11806	hypothetical protein	.	.
PADG_07991	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450]	.
PADG_02328	hypothetical protein	PF00462.19 Glutaredoxin[Glutaredoxin]	.
PADG_00403	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450]	.
PADG_01212	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450]	.
PADG_00813	hypothetical protein	PF08022.7 FAD_binding_8[FAD-binding domain];PF08030.7 NAD_binding_6[Ferric reductase NAD binding domain];PF01794.14 Ferric_reduct[Ferric reductase like transmembrane component]	.
PADG_01182	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450]	.
PADG_03226	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450]	.
PADG_02273	hypothetical protein	.	.

Continuação da Tabela 14

carbon-sulfur lyase activity (GO:0016846)			
PADG_02657	hypothetical protein	PF04828.9 GFA[Glutathione-dependent formaldehyde-activating enzyme]	.
PADG_02610	hypothetical protein	PF04828.9 GFA[Glutathione-dependent formaldehyde-activating enzyme]	.
PADG_04354	hypothetical protein	PF04828.9 GFA[Glutathione-dependent formaldehyde-activating enzyme]	.
PADG_05832	hypothetical protein	PF04828.9 GFA[Glutathione-dependent formaldehyde-activating enzyme]	.
PADG_01274	hypothetical protein	PF04828.9 GFA[Glutathione-dependent formaldehyde-activating enzyme]	.

5.14.2 Análise dos genes diferencialmente expressos na isolado YRT em diferentes condições experimentais

A análise comparativa do isolado YRT nas mesmas condições experimentais que a forma leveduriforme do isolado Pb339 (37° C, 5 dias de crescimento) permitiu identificar 462 (93,33%) genes regulados positivamente nessa linhagem. Desses 147 (31,8%) genes foram anotados funcionalmente contendo pelo menos um domínio funcional (Pfam) podendo também estar associado ou não a um termo anotador do GO, via metabólica (Kegg) e anotações para peptídeo sinal (Signal P) e domínios de transmembrana (TmHMM) e os demais genes (315 – 68,2%) foram identificados como hipotéticos, sem função predita. Destaca-se o gene anotado como uma formamidase, contendo o domínio FmdA_AmdA (Acetamidase/Formamidase Family - PF03069.10) regulado positivamente e o gene que codifica a uma proteína de transmembrana com domínio funcional de absorção e transporte de potássio (K_tran - PF02705.11; TIGR00794), descrito como regulado positivamente em hifas. As funções biológicas envolvendo genes classificados nos termos anotadores *gene expression*, *macromolecular complex*, *intracellular membrane-bounded organelle*, *cellular biosynthetic process*, *cellular macromolecule*, *metabolic process*, *cytoplasmic part* mostraram-se significativamente (q-valor<0.05) sub-representadas, além disso, não identificou-se enriquecimento significativo de funções biológicas ou genes envolvendo domínios conservados específicos nessas condições (Tabela 12 e Tabela 15). Em contraste, a análise o isolado Pb339 apresentou apenas 33 (6,66%). A análise de enriquecimento dos termos anotadores GO não apresentou resultados significativos.

Com relação a isolado YRT cultivada a TA com 5 dias de crescimento, comparada a forma leveduriforme do isolado Pb339, identificaram-se 386 (66,02%) genes diferencialmente expressos, e desses, 171 (44,30%) genes contendo anotação funcional (ao menos 1 domínio Pfam) e os demais genes (215 genes - 55,69%) foram anotados como hipotéticos. Destaca-se nessa isolado a presença da regulação positiva do gene codificador da enzima sulfite reductase (NADPH) contendo os domínios funcionais POR_N - Pyruvate flavodoxin/ferredoxin oxidoreductase, thiamine diP-bdg (PF01855.14) e NIR_SIR - Nitrite and sulphite reductase (PF01077.17) envolvido na via metabólica sulfito redutase (EC:1.8.1.2) e na biossíntese de cisteína. O gene contendo o domínio domínio central tirosinase (PF00264.15) envolvido no metabolismo da riboflavina (ko00740), biossíntese alcaloide de isoquinolina (ko00950),

Betalaina (ko00965) e no processo de melanogênese (ko04916) também mostrou-se regulado positivamente. O gene contendo o domínio funcional para a Acetamidase/Formamidase Family (PF03069.10) envolvido na via metabólica formamidase (EC:3.5.1.49) especialmente no metabolismo de nitrogênio (ko00910) foi identificado como diferencialmente expresso, juntamente com gene anotado como *potassium uptake protein*, contendo o domínio funcional de transmembrana com a função transportadora de K⁺ (PF02705.11), visto como específico da fase micelial, mas regulado positivamente na levedura YRT a TA. A análise de enriquecimento funcional (Tabela 12 e Tabela 16) apontou o termo anotador *co-fator binding* (GO:0048037) enriquecido significativamente (q-value<0.05) e, os termos anotadores, *macromolecular complex* (GO:0032991), *cellular macromolecule metabolic process* (GO:0044260), *intracellular part* (GO:0044424), sub-representados significativamente (q-valor<0.05). Com relação a levedura, o transcrito do isolado Pb339 apresentou 197 (33,7%) genes diferencialmente expressos, desses 166 (84,2%) com anotação funcional e 31 (15,8%) genes anotados como hipotéticos. Regulado positivamente, identificou-se o gene mitocondrial hsp60 contendo o domínio funcional GroEL chaperonin GroL (PF00118.19, TIGR02348) que codifica uma chaperonina com propriedades profiláticas e terapêuticas, caracterizada como um indutor da resposta imune protetiva do hospedeiro. O gene *catb* novamente foi identificado como diferencialmente expresso nessas condições, juntamente com os potenciais genes com a função mannosyltransferase contendo o domínio funcional *glycosyltransferase sugar-binding region containing DXD motif* (PF04488.10) e o gene com o domínio conservado de glycosil hydrolase (PF00332.13) presente na via metabólica da glucan 1,3-beta-glucosidase (EC:3.2.1.58). A análise funcional GO identificou como super-representados significativamente (q-value<0.05) os termos *rRNA binding* (GO:0019843), *large ribosomal subunit* (GO:0015934), *translational elongation* (GO:0006414), *ubiquinol-cytochrome-c reductase activity* (GO:0008121), *small ribosomal subunit* (GO:0015935), *structural constituent of ribosome* (GO:0003735), *sterol metabolic process* (GO:0016125) (tabela XX) e os termos *regulation of transcription* (GO:0045449), *DNA binding* (GO:0003677), *nucleus* (GO:0005634), *zinc ion binding* (GO:0008270), *adenyl nucleotide binding* (GO:0030554), *membrane* (GO:0016020) mostraram-se sub-representados significativamente (q-value<0.05). (Tabela 14). No isolado Pb339 apresentaram-se enriquecidos significativamente (q-value<0.05) os termos anotadores GO *oxidation reduction* (GO:0055114), *iron ion binding* (GO:0005506) e *monooxygenase activity* (GO:0004497), (Tabela 15). Em

contraste, os termos anotadores *protein binding* (GO:0005515), *cellular protein metabolic process* (GO:0044267), *macromolecular complex* (GO:0032991), *gene expression* (GO:0010467), *cytoplasm* (GO:0005737), *intracellular membrane-bounded organelle* (GO:0043231), *oxidation reduction* (GO:0055114), *iron ion binding* (GO:0005506), *monooxygenase activity* (GO:0004497) apresentaram-se sub-representados significativamente ($q\text{-value} < 0.05$) na análise ontológica (Tabela 16).

Ao comparar a isolado YRT com a forma micelial do isolado Pb339 nas mesmas condições experimentais (TA com 15 dias de crescimento), genes importantes para a fase leveduriforme como o AGS1 (α -glucana-sintase), os genes que codificam os fatores de transcrição *ryp2* contendo o domínio Velvet fator (PF11754.3), *ryp4* com os domínios (PF4082.13 e PF00172.13), apresentaram regulação positiva nessa linhagem. A análise de enriquecimento funcional identificou que genes relacionados a atividade oxidoreductase e atividade quinase apresentaram enriquecimento de função significativa ($q\text{-valor} < 0.05$) no transcrito do isolado YRT, bem como os genes contendo o domínio funcional MFS_1 (Major Facilitator Superfamily - PF07690.11) (fisher-P < 0.0001) (Tabela 14). Por outro lado, os termos GO *protein complex* (GO:0043234), *gene expression* (GO:0010467), *cellular macromolecule biosynthetic process* (GO:0034645), *intracellular organelle part* (GO:0044446), *cytoplasmic part* (GO:0044444), *intracellular membrane-bounded organelle* (GO:0043231), *nucleic acid binding* (GO:0003676), mostraram-se empobrecidos nesse transcrito (Tabela 12 e Tabela 17).

Tabela 15. Termos GO enriquecidos do transcrito do isolado YRT de *P. brasiliensis* cultivado a 37° C com 5 dias de crescimento.

Locus Pb18	Produto	Pfam	KeggEC
gene expression (GO:0010467)			
PADG_02034	hypothetical protein	PF13894.1 zf-C2H2_4[C2H2-type zinc finger];PF04082.13 Fungal_trans[Fungal specific transcription factor domain];PF00096.21 zf-C2H2[Zinc finger, C2H2 type];PF13465.1 zf-H2C2_2[Zinc-finger double domain]	.
PADG_07732	aspartate-tRNA(Asn) ligase	TIGR00458[aspS_nondisc: aspartate--tRNA(Asn) ligase];PF00152.15 tRNA-synt_2[tRNA synthetases class II (D, K and N)];PF09924.4 DUF2156[Uncharacterized conserved protein (DUF2156)];PF01336.20 tRNA_anti-codon[OB-fold nucleic acid binding domain]	.
macromolecular complex (GO:0032991)			
PADG_06138	hypothetical protein	PF02214.17 BTB_2[BTB/POZ domain];PF00651.26 BTB[BTB/POZ domain]	.
PADG_05569	hypothetical protein	.	.
intracellular membrane-bounded organelle (GO:0043231)			
PADG_11592	hypothetical protein	PF03306.8 AAL_decarboxy[Alpha-acetolactate decarboxylase]	.
PADG_02963	hypothetical protein	PF00505.14 HMG_box[HMG (high mobility group) box]	.
PADG_04398	hypothetical protein	PF13921.1 Myb_DNA-bind_6[Myb-like DNA-binding domain]	.
PADG_01346	hypothetical protein	PF00172.13 Zn_clus[Fungal Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster domain];PF11951.3 Fungal_trans_2[Fungal specific transcription factor domain]	.
PADG_04889	hypothetical protein	.	.
PADG_02034	hypothetical protein	PF13894.1 zf-C2H2_4[C2H2-type zinc finger];PF04082.13 Fungal_trans[Fungal specific transcription factor domain];PF00096.21 zf-C2H2[Zinc finger, C2H2 type];PF13465.1 zf-H2C2_2[Zinc-finger double domain]	.
PADG_11756	hypothetical protein	PF00884.18 Sulfatase[Sulfatase]	.
PADG_04643	hypothetical protein	PF00172.13 Zn_clus[Fungal Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster domain];PF11951.3 Fungal_trans_2[Fungal specific transcription factor domain]	.
cellular biosynthetic process(GO:0044249)			
PADG_00213	hypothetical protein	PF02558.11 ApbA[Ketopantoate reductase PanE/ApbA];PF08546.6 ApbA_C[Ketopantoate reductase PanE/ApbA C terminal]	.
PADG_07732	aspartate-tRNA(Asn) ligase	TIGR00458[aspS_nondisc: aspartate--tRNA(Asn) ligase];PF00152.15 tRNA-synt_2[tRNA synthetases class II (D, K and N)];PF09924.4 DUF2156[Uncharacterized conserved protein (DUF2156)];PF01336.20 tRNA_anti-codon[OB-fold nucleic acid binding domain]	.
PADG_06061	phosphoadenosine phosphosulfate reductase	TIGR00434[cysH: phosphoadenylyl-sulfate reductase];TIGR02057[PAPS_reductase: phosphoadenosine phosphosulfate reductase];PF01507.14 PAPS_reduct[Phosphoadenosine phosphosulfate reductase family]	EC:1.8.4.8[Phosphoadenylyl-sulfate reductase (thioredoxin).]

Continuação da Tabela 15

PADG_02034	hypothetical protein	PF13894.1 zf-C2H2_4[C2H2-type zinc finger];PF04082.13 Fungal_trans[Fungal specific transcription factor domain];PF00096.21 zf-C2H2[Zinc finger, C2H2 type];PF13465.1 zf-H2C2_2[Zinc-finger double domain]	.
cellular macromolecule metabolic process(GO:0044260)			
PADG_11542	hypothetical protein	.	.
PADG_02963	hypothetical protein	PF00505.14 HMG_box[HMG (high mobility group) box]	.
PADG_04398	hypothetical protein	PF13921.1 Myb_DNA-bind_6[Myb-like DNA-binding domain]	.
PADG_04720	hypothetical protein	PF00145.12 DNA_methylase[C-5 cytosine-specific DNA methylase]	.
PADG_01279	hypothetical protein	.	.
PADG_11345	hypothetical protein	.	.
PADG_12058	hypothetical protein	.	.
PADG_12490	hypothetical protein	PF00098.18 zf-CCHC[Zinc knuckle]	.
PADG_11276	hypothetical protein	.	.
PADG_02034	hypothetical protein	PF13894.1 zf-C2H2_4[C2H2-type zinc finger];PF04082.13 Fungal_trans[Fungal specific transcription factor domain];PF00096.21 zf-C2H2[Zinc finger, C2H2 type];PF13465.1 zf-H2C2_2[Zinc-finger double domain]	.
PADG_04390	hypothetical protein	.	.
PADG_07732	aspartate-tRNA(Asn) ligase	TIGR00458[aspS_nondisc: aspartate--tRNA(Asn) ligase];PF00152.15 tRNA-synt_2[tRNA synthetases class II (D, K and N)];PF09924.4 DUF2156[Uncharacterized conserved protein (DUF2156)];PF01336.20 tRNA_anti-codon[OB-fold nucleic acid binding domain]	.
cytoplasmic part (GO:0044444)			
PADG_11592	hypothetical protein	PF03306.8 AAL_decarboxy[Alpha-acetolactate decarboxylase]	.
PADG_11756	hypothetical protein	PF00884.18 Sulfatase[Sulfatase]	.

Tabela 16. Termos GO enriquecidos do transcrito do isolado YRT de *P. brasiliensis* cultivado a TA com 5 dias de crescimento.

Locus Pb18	Produto	Pfam	KeggEC
cofactor binding (GO:0048037)			
PADG_12062	hypothetical protein	.	.
PADG_11390	hypothetical protein	.	.
PADG_04114	L-serine dehydratase/L-threonine deaminase	.	.
PADG_08406	O-acetylhomoserine (thiol)-lyase	PF00155.16 Aminotran_1_2[Aminotransferase class I and II];PF01041.12 DegT_DnrJ_EryC1[DegT/DnrJ/EryC1/StrS aminotransferase family];TIGR01326[OAH_OAS_sulphy: O-acetylhomoserine aminocarboxypropyltransferase/cysteine synthase];PF00266.14 Aminotran_5[Aminotransferase class-V];PF01053.15 Cys_Met_Meta_PP[Cys/Met metabolism PLP-dependent enzyme]	EC:2.5.1.49[O-acetylhomoserine aminocarboxypropyltransferase.]
PADG_11705	hypothetical protein	PF00291.20 PALP[Pyridoxal-phosphate dependent enzyme]	.
PADG_01843	hypothetical protein	PF00501.23 AMP-binding[AMP-binding enzyme];PF00975.15 Thioesterase[Thioesterase domain];PF00550.20 PP-binding[Phosphopantetheine attachment site]	.
PADG_06784	hypothetical protein	PF00501.23 AMP-binding[AMP-binding enzyme];PF07993.7 NAD_binding_4[Male sterility protein];PF00550.20 PP-binding[Phosphopantetheine attachment site];PF01370.16 Epimerase[NAD dependent epimerase/dehydratase family]	.
PADG_11456	hypothetical protein	PF01179.15 Cu_amine_oxid[Copper amine oxidase, enzyme domain]	.
PADG_04364	hypothetical protein	PF01370.16 Epimerase[NAD dependent epimerase/dehydratase family]	.
PADG_11457	hypothetical protein	PF02727.11 Cu_amine_oxidN2[Copper amine oxidase, N2 domain];PF01179.15 Cu_amine_oxid[Copper amine oxidase, enzyme domain]	.
PADG_05276	hypothetical protein	PF03473.12 MOSC[MOSC domain];PF03476.11 MOSC_N[MOSC N-terminal beta barrel domain]	.
PADG_07811	hypothetical protein	PF04321.12 RmID_sub_bind[RmID substrate binding domain];PF01073.14 3Beta_HSD[3-beta hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase family];PF01370.16 Epimerase[NAD dependent epimerase/dehydratase family]	.
PADG_06767	hypothetical protein	PF13460.1 NAD_binding_10[NADH(P)-binding];PF00106.20 adh_short[short chain dehydrogenase];PF01073.14 3Beta_HSD[3-beta hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase family];PF01370.16 Epimerase[NAD dependent epimerase/dehydratase family]	.

Continuação da Tabela 16

PADG_02101	hypothetical protein	PF01593.19 Amino_oxidase[Flavin containing amine oxidoreductase];PF14691.1 Fer4_20[Dihydropyrimidine dehydrogenase domain II, 4Fe-4S cluster];PF13450.1 NAD_binding_8[NAD(P)-binding Rossmann-like domain];PF01493.14 GXGXG[GXGXG motif];PF00070.22 Pyr_redox[Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase];PF04898.9 Glu_syn_central[Glutamate synthase central domain];PF00310.16 GATase_2[Glutamine amidotransferases class-II];PF07992.9 Pyr_redox_2[Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase];PF01645.12 Glu_synthase[Conserved region in glutamate synthase];TIGR01317[GOGAT_sm_gam: glutamate synthase, NADH/NADPH, small subunit]	EC:1.4.1.13[Glutamate synthase (NADPH).];EC:1.4.1.14[Glutamate synthase (NADH).]
PADG_03395	sulfite reductase (NADPH) hemoprotein, beta-component	PF01855.14 POR_N[Pyruvate flavodoxin/ferredoxin oxidoreductase, thiamine diP-bdg];PF01077.17 NIR_SIR[Nitrite and sulphite reductase 4Fe-4S domain];PF03460.12 NIR_SIR_ferr[Nitrite/Sulfite reductase ferredoxin-like half domain];PF00258.20 Flavodoxin_1[Flavodoxin]	EC:1.8.1.2[Sulfite reductase (NADPH).]
PADG_05079	hypothetical protein	PF07287.6 DUF1446[Protein of unknown function (DUF1446)]	.
PADG_02635	hypothetical protein	PF00501.23 AMP-binding[AMP-binding enzyme];PF13193.1 AMP-binding_C[AMP-binding enzyme C-terminal domain]	.
PADG_02734	hypothetical protein	PF00501.23 AMP-binding[AMP-binding enzyme];PF13193.1 AMP-binding_C[AMP-binding enzyme C-terminal domain]	.
PADG_02782	hypothetical protein	PF01266.19 DAO[FAD dependent oxidoreductase];PF13450.1 NAD_binding_8[NAD(P)-binding Rossmann-like domain]	.
PADG_01433	hypothetical protein	PF13460.1 NAD_binding_10[NADH(P)-binding];PF05368.8 NmrA[NmrA-like family]	.

Tabela 17. Termos GO enriquecidos do transcrito do isolado YRT de *P. brasiliensis* cultivado a TA com 15 dias de crescimento.

Locus Pb18	Produto	Pfam	KeggEC
		oxidoreductase activity	
PADG_04701	hypothetical protein	PF00107.21 ADH_zinc_N[Zinc-binding dehydrogenase];PF08240.7 ADH_N[Alcohol dehydrogenase GroES-like domain]	.
PADG_05756	hypothetical protein	PF00070.22 Pyr_redox[Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase];PF07992.9 Pyr_redox_2[Pyridine	.
PADG_08719	hypothetical protein	PF08022.7 FAD_binding_8[FAD-binding domain];PF08030.7 NAD_binding_6[Ferric reductase NAD binding domain];PF01794.14 Ferric_reduct[Ferric	.
PADG_02782	hypothetical protein	PF01266.19 DAO[FAD dependent oxidoreductase];PF13450.1 NAD_binding_8[NAD(P)-binding Rossmann-like domain]	.
PADG_07435	hypothetical protein	PF13561.1 adh_short_C2[Enoyl-(Acyl carrier protein) reductase];PF08659.5 KR[KR domain];PF00106.20 adh_short[short chain	EC:1.-.-.-[Oxidoreductases.]
PADG_00148	hypothetical protein	PF08031.7 BBE[Berberine and berberine like];PF01565.18 FAD_binding_4[FAD binding	.
PADG_02817	hypothetical protein	.	.
PADG_06006	hypothetical protein	PF13561.1 adh_short_C2[Enoyl-(Acyl carrier protein) reductase];PF08659.5 KR[KR domain];PF00106.20 adh_short[short chain	.
PADG_00316	hypothetical protein	.	.
PADG_07748	hypothetical protein	PF00106.20 adh_short[short chain	.
PADG_07092	hypothetical protein	PF07731.9 Cu-oxidase_2[Multicopper oxidase];PF07732.10 Cu-oxidase_3[Multicopper oxidase];PF00394.17 Cu-oxidase[Multicopper	.
PADG_11154	hypothetical protein	PF01179.15 Cu_amine_oxid[Copper amine oxidase, enzyme domain]	.
PADG_02178	hypothetical protein	PF00248.16 Aldo_ket_red[Aldo/keto reductase	.
PADG_01888	hypothetical protein	PF00248.16 Aldo_ket_red[Aldo/keto reductase	.
PADG_04332	hypothetical protein	PF00107.21 ADH_zinc_N[Zinc-binding dehydrogenase];PF08240.7 ADH_N[Alcohol dehydrogenase GroES-like domain];PF13602.1 ADH_zinc_N_2[Zinc-binding	.
PADG_03790	hypothetical protein	PF13668.1 Ferritin_2[Ferritin-like domain]	.
PADG_05499	hypothetical protein	.	.

Continuação da Tabela 17

PADG_12403	hypothetical protein	.	.
PADG_12404	hypothetical protein	.	.
PADG_07269	hypothetical protein	PF00067.17 p450[Cytochrome P450]	EC:1.14.13.-[With NADH or NADPH as one donor, and incorporation of one atom of oxygen.]
PADG_04923	hypothetical protein	.	.
PADG_06309	hypothetical protein	PF05199.8 GMC_oxred_C[GMC oxidoreductase];PF00732.14 GMC_oxred_N[GMC oxidoreductase]	.
protein kinase activity			
PADG_04224	hypothetical protein	.	.
PADG_07588	hypothetical protein	.	.
PADG_00276	hypothetical protein	PF00069.20 Pkinase[Protein kinase domain]	.
PADG_11134	hypothetical protein	.	.
PADG_11507	hypothetical protein	.	.
PADG_04520	hypothetical protein	.	.
PADG_05114	hypothetical protein	PF00069.20 Pkinase[Protein kinase domain]	.
PADG_05314	hypothetical protein	.	.
PADG_08145	hypothetical protein	.	.
PADG_11033	hypothetical protein	.	.
PADG_11116	AGC/RSK/RSKP70 protein kinase	PF00069.20 Pkinase[Protein kinase domain];PF07714.12 Pkinase_Tyr[Protein tyrosine	.
PADG_07783	hypothetical protein	PF01636.18 APH[Phosphotransferase enzyme family];PF01633.15 Choline_kinase[Choline/ethanolamine kinase];PF02958.15 EcKinase[Ecdysteroid	.
PADG_06799	CAMK/CAMKL/KIN4 protein kinase	PF00069.20 Pkinase[Protein kinase domain];PF07714.12 Pkinase_Tyr[Protein tyrosine	EC:2.7.11.-[Protein-serine/threonine kinases.]
PADG_07941	CAMK/CAMKL/GIN4 protein kinase	PF00069.20 Pkinase[Protein kinase domain];PF07714.12 Pkinase_Tyr[Protein tyrosine	.
PADG_06797	hypothetical protein	PF00069.20 Pkinase[Protein kinase domain];PF07714.12 Pkinase_Tyr[Protein tyrosine	.
PADG_07603	hypothetical protein	.	.
PADG_02106	hypothetical protein	.	.
PADG_00014	hypothetical protein	PF00069.20 Pkinase[Protein kinase domain]	.
PADG_02107	hypothetical protein	.	.
PADG_03553	hypothetical protein	PF00069.20 Pkinase[Protein kinase domain]	.
PADG_02106	hypothetical protein	.	.
PADG_11554	hypothetical protein	.	.

5.14.3 Análises dos genes preferencialmente expressos na isolado YRT

Os valores de FPKM de cada condição foram agrupados pelo método de clusterização *k-means*, parametrizado para formar 6 conjuntos de dados (*k-means*=6) com valores semelhantes entre si. A representação gráfica desses grupos denominada *heatmap* (Figura 32), permite observar a homogeneidade entre as réplicas biológicas e a regulação genica das amostras (Figura 26). As amostras YRT, defectivas para o dimorfismo térmico, apresentaram perfis transcricionais variáveis entre as condições experimentais adotadas. A Destacar o terceiro cluster gênico (Figura 26 retângulo vermelho 1), sendo identificados 107 genes regulados positivamente, específicos para a isolado YRT nas condições de TA com 15 dias de crescimento (YRT_TA_15D) com relação às duas condições experimentais da levedura (Pb339_L) e do micélio (Pb339_M) (Tabela 18). Desses total de 28/107 (26,16%) genes foram anotados e os demais foram identificados como hipotéticos. O conteúdo gênico dessa análise apresentou em especial 2 genes álcool desidrogenase contendo as assinaturas funcionais ADH_zinc_N (PF00107.21) e ADH_N GroES-like domain (PF08240.7) envolvidos em vários processos metabólicos entre eles os de ácidos graxos (ko00071) e metabolismo de drogas (ko00982 cytochrome P450) e o gene codificador da enzima multidomínio *xanthine dehydrogenase* também envolvida no metabolismo de drogas (ko00983), sendo parte da via metabólica *Xanthine oxidase* (EC:1.17.3.2) e *Xanthine dehydrogenase* (EC:1.17.1.4). Associado a atividade de transporte transmembrana identificaram-se genes com os domínios MFS_1 (PF07690.11) e a bomba de efluxo TRI12 (PF06609.8) (Tabela 18).

Na condição de 37° C com 5 dias de crescimento (YRT_37_5D) na Figura 26, *cluster* 5 (barra cor-de-rosa), não identificaram-se genes diferencialmente expressos significativamente nessa condição experimental, comparado ao isolado Pb339 L.

Figura 26. Análise comparativa do perfil transcricional do isolado YRT e do isolado Pb339 em diferentes condições experimentais.

Considerou-se para essa análise a média dos valores de FPKM normalizados de cada amostra. Variação da cor azul na escala de cores, da mais forte a mais fraca, representa a regulação negativa da expressão gênica e a variação da cor vermelha, da mais fraca a mais forte, representa a regulação positiva da expressão gênica; à esquerda, a escala de 6 cores na vertical, representa os clusters gênicos das amostras; retângulo vermelho destaca os genes diferencialmente expressos.

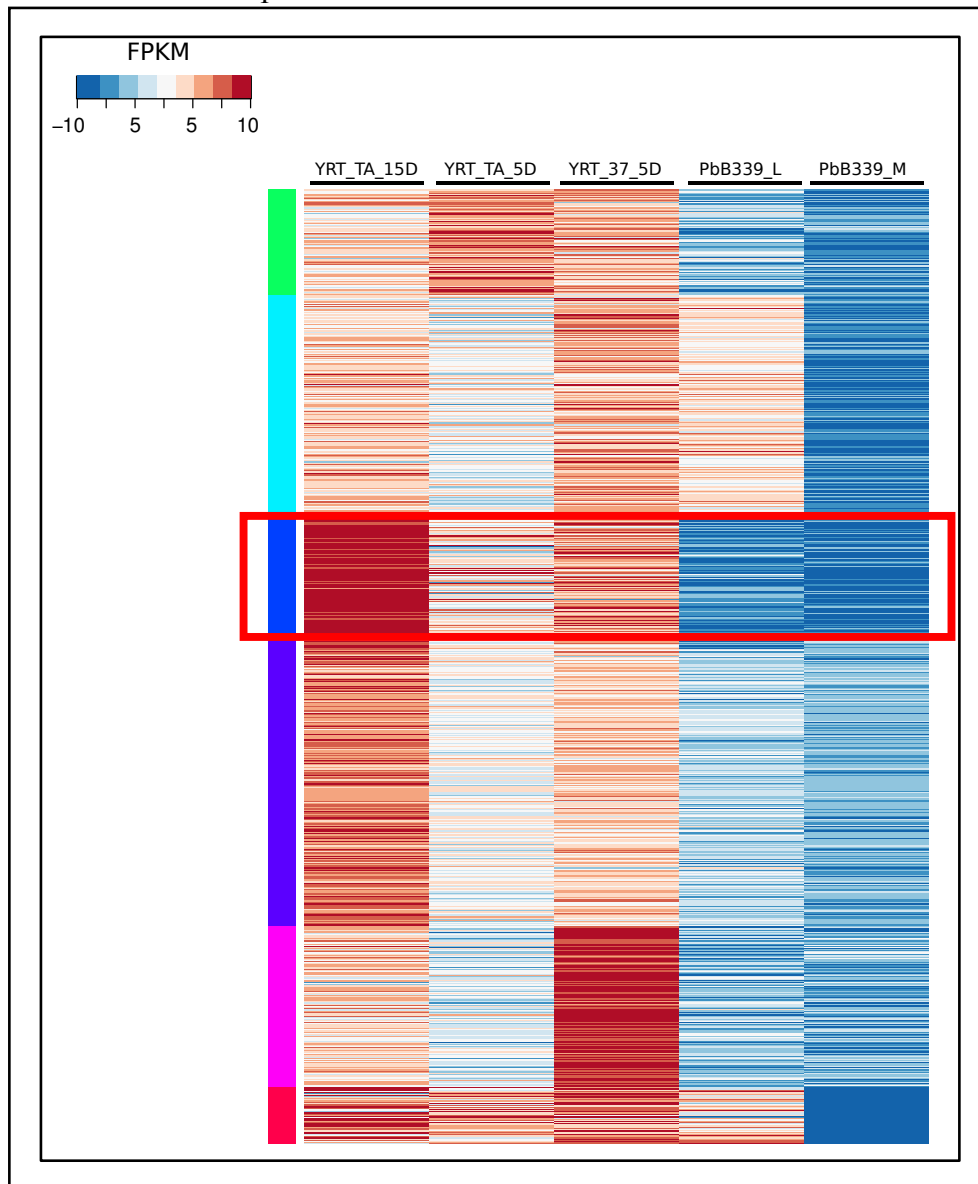


Tabela 18. Genes específicos do isolado YRT a TA com 15 dias de crescimento.

locus (BROAD)	gi ID 1st Hit (NCBI)	ID 1st Hit (NCBI)	Prod_name (NCBI)	Prod_name (BROAD)	Pfam	KeggEC	KeggPathways	sigP4	TmHM M	TopKeggBlast
PADG_04701	295666161	XP_002793631.1	alcohol dehydrogenase [Paracoccidioides sp. 'lutzii' Pb01] alcohol dehydrogenase [Paracoccidioides sp. 'lutzii' Pb01]	hypothetical protein	PF00107.21 ADH_zinc_N[Zinc-binding dehydrogenase];PF08240.7 ADH_N[Alcohol dehydrogenase GroES-like domain]	.	ko00071[Fatty acid metabolism];ko00982[Drug metabolism - cytochrome P450];ko00626[Naphthalene degradation];ko00350[Tyrosine metabolism];ko00980[Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450];ko00625[Chloroalkane and chloroalkene degradation];ko00830[Retinol]	.	.	bmj:BMULJ_05633 adh alcohol dehydrogenase (EC:1.1.1.1)
PADG_05658	226294159	EEH49579.1	conserved hypothetical protein [Paracoccidioides brasiliensis]	hypothetical protein	PF01613.13 Flavin_Reduct[Flavin reductase like domain]	.		SigP4[DScore :0.518]	.	ppo:PPM_0504 ydfE; hypothetical protein
PADG_00345	226288544	EEH44056.1	HHE domain-containing protein [Paracoccidioides]	hypothetical protein	PF01814.18 Hemerythrin[Hemerythrin HHE cation binding domain]
PADG_00194	225683138	EEH21422.1	conserved hypothetical protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb03] conserved hypothetical protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]	hypothetical protein	PF01284.18 MARVEL[Membrane-associating domain]	.		.	TMH:4	.
PADG_00315	226288514	EEH44026.1	carbonic anhydrase [Paracoccidioides brasiliensis]	hypothetical protein	PF00484.14 Pro_CA[Carbonic anhydrase]	EC:4.2.1.1[Carbonate dehydratase.]		.	.	.
PADG_00735	295671454	XP_002796274.1	conserved hypothetical protein [Paracoccidioides sp. 'lutzii' Pb01] conserved hypothetical protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb03] conserved hypothetical protein [Paracoccidioides sp. 'lutzii' Pb01] conserved hypothetical protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]	lactam utilization protein lamB	PF03746.11 LamB_YcsF[LamB/YcsF family]	.		.	.	tth:TT_P0137 lamB; LamB/YcsF family prote K07160 UPF0271 prote
PADG_05657	225684500	EEH22784.1	pyruvate decarboxylase [Paracoccidioides brasiliensis Pb03]	hypothetical protein	PF02776.13 TPP_enzyme_N[Thiamine pyrophosphate enzyme, N-terminal TPP binding domain];PF02775.16 TPP_enzyme_C[Thiamine pyrophosphate enzyme, C-terminal TPP binding domain];PF0289.17 CPSase_L_chain[Carbamoyl-phosphate synthase L chain, N-terminal domain];PF07478.8 Dala_Dala_lig_C[D-ala D-ala ligase C-terminus];PF02682.11 AHS1[Allophanate hydrolase subunit 1];PF00364.17 Biotin_lipoyl[Biotin-requiring enzyme];PF13535.1 ATP-grasp_4[ATP-grasp domain];PF02785.14 Biotin_carb_C[Biotin carboxylase C-terminal domain];PF02786.12 CPSase_L_D2[Carbamoyl-phosphate synthase L chain, ATP					
PADG_00734	226288933	EEH44445.1	acetyl-/propionyl-coenzyme A carboxylase alpha chain [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]	urea carboxylase	PF02776.13 TPP_enzyme_N[Thiamine pyrophosphate enzyme, N-terminal TPP binding domain];PF02775.16 TPP_enzyme_C[Thiamine pyrophosphate enzyme, C-terminal TPP binding domain];PF0289.17 CPSase_L_chain[Carbamoyl-phosphate synthase L chain, N-terminal domain];PF07478.8 Dala_Dala_lig_C[D-ala D-ala ligase C-terminus];PF02682.11 AHS1[Allophanate hydrolase subunit 1];PF00364.17 Biotin_lipoyl[Biotin-requiring enzyme];PF13535.1 ATP-grasp_4[ATP-grasp domain];PF02785.14 Biotin_carb_C[Biotin carboxylase C-terminal domain];PF02786.12 CPSase_L_D2[Carbamoyl-phosphate synthase L chain, ATP	EC:6.4.1.3[Propionyl-CoA carboxylase.]				axy:AXYL_05232 uca; u carboxylase (EC:6.3.4.6 K01941 urea carboxylase [EC:6.3.4.6]

Continuação da Tabela 18

PADG_03681	226292177	EEH47597.1	long chain base Stimulates Phosphorylation [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]	hypothetical protein	PF13805.1 Pil1[Eisosome component Pil1]
PADG_02591	225679344	EEH17628.1	amidase [Paracoccidioides brasiliensis Pb03]	hypothetical protein	PF01425.16 Amidase[Amidase]	cnc:CNE_2c11330 gatA2; glutRNA(Gln) amidotransferase subunit A (EC:6.3.5.-)
PADG_00793	226288992	EEH44504.1	aldose 1-epimerase [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]	hypothetical protein	PF01263.15 Aldose_epim[Aldose 1-epimerase]	pmr:PM11948 galM; aldose epimerase (EC:5.1.3.3); K017 aldose 1-epimerase [EC:5.1.3.3]
PADG_02251	226290617	EEH46101.1	conserved hypothetical protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]	hypothetical protein	PF02805.11 Ada_Zn_binding[Metal binding domain of Ada];PF00165.18 HTH_AraC[Bacterial regulatory helix-turn-helix proteins, AraC family]	azl:AZL_a05180 ada; methyl DNA-[protein]-cysteine S-methyltransferase (EC:2.1.1.10778 AraC family transcriptional regulator, regulatory protein adaptive response / methyl DNA-[protein]-cysteine methyltransferase [EC:2.1.1.10778]
PADG_02199	225678378	EEH16662.1	conserved hypothetical protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb03]	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily]	TMH:12
PADG_04466	295659570	XP_002790343.1	hypothetical protein PAAG_07642 [Paracoccidioides sp. 'lutzii']	hypothetical protein	PF06355.8 Aegerolysin[Aegerolysin]
PADG_00325	295671797	XP_002796445.1	Pb01]high-affinity glucose transporter [Paracoccidioides sp. 'lutzii']	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily];TIGR00879[SP: MFS transporter, sugar porter (SP) family];PF00083.19 Sugar_tr[Sugar (and other) transporter]	TMH:12
PADG_00082	226288281	EEH43793.1	acetamidase [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]	hypothetical protein	PF01425.16 Amidase[Amidase]
PADG_07972	295662653	XP_002791880.1	conserved hypothetical protein [Paracoccidioides sp. 'lutzii']	hypothetical protein	PF00412.17 LIM[LIM domain]	smp:SMAC_04349 lrg1; LRG protein
PADG_05059	225684135	EEH22419.1	predicted protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb03]	hypothetical protein	PF13391.1 HNNH_2[HNNH endonuclease]
PADG_00806	225681793	EEH20077.1	conserved hypothetical protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb03]	hypothetical protein	PF00651.26 BTB[BTB/POZ domain]
PADG_11405	225678313	EEH16597.1	alcohol dehydrogenase [Paracoccidioides brasiliensis Pb03]	alcohol dehydrogenase 1	PF00107.21 ADH_zinc_N[Zinc-binding dehydrogenase];PF08240.7 ADH_N[Alcohol dehydrogenase GroES-like domain]	ko00071[Fatty acid metabolism];ko00982[Drug metabolism - cytochrome P450];ko00626[Naphthalene degradation];ko00350[Tyrosine metabolism];ko00980[Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450];ko00625[Chloroalkane and chloroalkene degradation];ko00830[Retinol metabolism]

Continuação Tabela 18

PADG_06145	226294646	EEH50066.1	F-box domain-containing protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]	hypothetical protein	PF00646.28 F-box[F-box domain]				
PADG_06197	225678585	EEH16869.1	xanthine dehydrogenase [Paracoccidioides brasiliensis Pb03]	xanthine dehydrogenase, molybdopterin binding subunit	PF00941.16 FAD_binding_5[FAD binding domain in molybdopterin dehydrogenase];PF03450.12 CO_deh_flav_C[CO dehydrogenase flavoprotein C-terminal domain];PF02738.13 Ald_Xan_dh_C2[Molybdopterin-binding domain of aldehyde dehydrogenase];PF01799.15 Fer2_2[[2Fe-2S] binding domain];PF00111.22 Fer2[2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain];PF01315.17 Ald_Xan_dh_C[Aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase, a/b hammerhead domain]	EC:1.17.3.2[Xanthine oxidase.];EC:1.17.1.4[Xanthine dehydrogenase.]	ko04146[Peroxisome];ko00232[Caffeine metabolism];ko00983[Drug metabolism - other enzymes]		
PADG_03928	226294244	EEH47844.1	major facilitator superfamily transporter [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily];PF06609.8 TRI12[Fungal trichothecene efflux pump (TRI12)]				TMH:13
PADG_04036	225680833	EEH19117.1	sulfate permease [Paracoccidioides brasiliensis Pb03]	hypothetical protein	TIGR00815[sulP: sulfate permease];PF01740.16 STAS[STAS domain];PF00916.15 Sulfate_transp[Sulfate transporter family];PF13792.1 Sulfate_tra_GLY[Sulfate transporter N-terminal domain with GLY motif]				TMH:11
PADG_11154	225681773	EEH20057.1	conserved hypothetical protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb03]	hypothetical protein	PF01179.15 Cu_amine_oxid[Copper amine oxidase, enzyme domain]				
PADG_06306	226294807	EEH50227.1	arrestin [Paracoccidioides brasiliensis Pb18]	hypothetical protein	PF00339.24 Arrestin_N[Arrestin (or S-antigen), N-terminal domain]				
PADG_06107	225685272	EEH23556.1	conserved hypothetical protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb03]	hypothetical protein	PF07690.11 MFS_1[Major Facilitator Superfamily]				TMH:12
PADG_05313	225684193	EEH22477.1	conserved hypothetical protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb03]	hypothetical protein	PF09949.4 DUF2183[Uncharacterized conserved protein (DUF2183)]				
PADG_07490	225683536	EEH21820.1	conserved hypothetical protein [Paracoccidioides brasiliensis Pb03]	hypothetical protein	PF01596.12 Methyltransf_3[O-methyltransferase];PF13578.1 Methyltransf_24[Methyltransferase domain]				tmo:TMO_a0266 mdmC; O-methyltransferase mdmC

5.15 Análise de variantes genéticas no transcrito do isolado YRT

A identificação de variantes genéticas na isolado YRT foi realizada utilizando a ferramenta GATK (<https://software.broadinstitute.org/gatk/>). Os critérios utilizados para essa análise considerou as leituras (*reads*) com valor phred ≥ 30 (confiança de 99.9%) e cobertura $\geq 30x$ (reads/região). A anotação foi realizada utilizando a ferramenta SnpEff (*Genetic variant annotation and effect prediction toolbox*- <http://snpeff.sourceforge.net/>) e o genoma de referencia Pb18v2. O arquivo de saída no formato vcf (*Variant Call Format*) com todos os resultados dessa análise pode ser consultado no Apêndice VIII (1-DadoSuplementar_125_YRT-variantes).

A análise do isolado Pb339 resultou em apenas 4 variantes genéticas, todos em regiões intergenicas. Por outro lado, a isolado YRT apresentou 125 regiões variantes únicas, contudo, a maioria com baixa confiabilidade (< 30 *reads* de cobertura na região). Entretanto, as regiões variantes identificadas dentro do critério de confiança apontaram 4 genes com mutações com potencial perda de função, valendo a pena destacar: a) o gene PADG_06961 codificador de uma proteína citoplasmática contendo a assinatura Usp (*Universal stress protein Family* - PF00582.21), importante na resposta de agentes estressantes, homóloga *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* e conservada também bactérias; b) O gene PADG_07801 anotado como hipotético, mas contendo 5 assinaturas TPR (*Tetratricopeptide repeat* - PF13374.1|TPR_10; PF00515.23|TPR_1; PF13181.1|TPR_8; PF13414.1|TPR_11; PF07719.12|TPR_2) e uma assinatura da família Glycosyl transferase (PF13844.1|Glyco_transf_41), com função enzimática que catalisa a adição de *O-linked beta-N-acetylglucosamine* (O-GlcNAc) para resíduos de treonina e serina (Tabela 21).

Adicionalmente, 2 genes com mutações não sinônimas foram identificados, sendo o primeiro, o gene PADG_02898 anotado como MAP3K, componente de ativação da via de transdução de sinal das MAPKinasas, contendo as assinaturas *kinase-like* (PF14531.1), *protein kinase domain* (PF00069.20) e *protein tyrosine kinase* (PF07714.12), envolvida na via de ativação *mitogen-activated protein kinase kinase kinase* (EC:2.7.11.25). O segundo gene (PADG_03464) codificador de uma potencial proteína de morfogênese celular, apresentando os domínios funcionais MOR2-PAG1_C (Cell morphogenesis C-terminal - PF14225.1), MOR2-PAG1_N (Cell morphogenesis N-terminal - PF14222.1) e MOR2-PAG1_mid (Cell morphogenesis central region - PF14228.1), conservados em espécies dos gêneros *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Emmonsia*. Em *S. cerevisiae* e *C. albicans* está envolvida

na polaridade celular e na morfogênese da hifa, (Tabela 19), (Jorgensen *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2008).

Tabela 19. Análise de variantes genéticos na isolado YRT de *P. brasiliensis*.

Locus	Produto genico	Pfam	KeggEC	TopKeggBlast
PERDA DE FUNÇÃO				
PADG_04926	autophagy-related protein	PF04109.11 APG9[Autophagy protein Apg9]	.	ddi:DDB_G0285323 atg9; autophagy protein
PADG_05649	cytoplasmic tRNA 2-thiolation protein 2	PF10288.4 DUF2392[Protein of unknown function (DUF2392)]	.	.
PADG_06961	universal stress protein	PF00582.21 Usp[Universal stress protein family]	.	.
PADG_07801	hipotetical protein	PF13374.1 TPR_10[Tetratricopeptide repeat];PF00515.23 TPR_1[Tetratricopeptide repeat];PF13181.1 TPR_8[Tetratricopeptide repeat];PF13844.1 Glyco_transf_41[Glycosyl transferase family 41];PF13414.1 TPR_11[TPR repeat];PF07719.12 TPR_2[Tetratricopeptide repeat]	.	.
NÃO SINONIMA				
PADG_02898	MAP kinase wis4 (STE/STE11/SSK protein kinase)	PF14531.1 Kinase-like[Kinase-like];PF00069.20 Pkinase[Protein kinase domain];PF07714.12 Pkinase_Tyr[Protein tyrosine kinase]	EC:2.7.11.25[Mitogen- activated protein kinase kinase kinase.]	.
PADG_03464	TAO3/PAG1	PF14225.1 MOR2-PAG1_C[Cell morphogenesis C-terminal];PF14222.1 MOR2-PAG1_N[Cell morphogenesis N-terminal];PF14228.1 MOR2-PAG1_mid[Cell morphogenesis central region]	.	.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, apresentam-se os resultados da caracterização morfológica, fisiológica e molecular de um isolado atípico de *Paracoccidioides brasiliensis*, defectiva no dimorfismo térmico, apresentando colônias cerebriformes e células leveduriformes à temperatura ambiente, em Ágar YPD. A linhagem, denominada YRT (*Yeast at Room Temperature*), é derivada do isolado clínico Pb339 (*P. brasiliensis* S1) por meio de um processo de seleção por múltiplos passos, na presença de sulfametoxazol (SMZ) (400µg/mL, droga incorporada ao Ágar YPD). É interessante mencionarmos que, conquanto não haja discordâncias quanto à classificação do isolado Pb339 como pertencente à espécie *P. brasiliensis*, há alguma controvérsia na literatura sobre a sua tipificação como S1 (Matute et al., 2006; Marini (Matute et al., 2006; Marini et al., 2010; Theodoro et al., 2012; Alves et al., 2015) ou se da espécie filogenética PS3 (Salgado-Salazar et al., 2010; Bocca et al., 2013; Hahn et al., 2014) controvérsia que talvez seja função das metodologias de análise empregadas.

O processo seletivo buscou, inicialmente, a estabilidade do fenótipo atípico na presença de SMZ e, sucessivamente, a estabilidade desse fenótipo também na ausência da droga. Nessa condição, ausência da droga, cerca de 80% das amostras reverteram o fenótipo atípico, e apenas 3 (amostras Pb339-S400_F3, Pb339-S400_K1 e Pb339-S400_F5) o sustentaram por um período mais prolongado. Dessas, apenas a amostra Pb339-S400_F5 manteve o fenótipo defectivo ao final de um longo período e foi denominada YRT. A estabilidade do fenótipo na isolado atípico YRT foi tratado como um aspecto central do processo seletivo em função da existência de relatos que, após terem observado amostras do fungo com fenótipo semelhante ao descrito neste trabalho, decorrentes ou não da ação prévia de agentes estressores (Hallak et al., 1982; Villar et al., 1988; Villar e Restrepo, 1989; San-Blas e San-Blas, 1992), destacaram amplamente o seu caráter instável.

À microscopia ótica, as células do isolado YRT, tanto à TA quanto a 37°C, tem morfologia irregular, formas catenuladas, globosas ou ovóides, até trapezoides, e há aquelas semelhantes a pseudo-hifas. Tanto à TA quanto a 37°C, não foram observadas as “rodas de leme” típicas, leveduras com múltiplos brotamentos característicos que são observáveis, com relativa facilidade, no isolado parental Pb339. A isolado YRT sobrevive com bom crescimento a 37°C, o seu aspecto celular é ainda mais fortemente grumado, como se não ocorresse o desprendimento de brotos jovens e estes, sucessivamente, voltassem a brotar, num aspecto radial. A 37°C, a isolado YRT apresentou forte aderência ao Ágar, ao contrário do que se observa com o isolado parental Pb339 e com amostras de *Paracoccidioides sp.*

mantidas regularmente em laboratório. As tentativas de determinação das curvas de crescimento foram extremamente dificultadas pela presença de numerosos grumos, fortes agregados celulares que se depositavam em cultivos realizados em meios líquidos. Entre os trabalhos clássicos relativos às curvas de crescimento de isolados de *P. brasiliensis*, o de Arango e Restrepo (1976) é pioneiro e estabeleceu claras distinções entre os padrões observados para a fase micelial e a fase leveduriforme do fungo. O padrão por nós observado de crescimento das culturas YRT, a 37°C e à TA, mostrou-se similar ao controle parental Pb339 a 37°C, observando-se crescimento comparável à fase logarítmica após as primeiras 24 horas e até o 6º dia de crescimento (Arango e Restrepo, 1976). Esse resultado é semelhante a um dos três padrões de crescimento descritos por Kashino e colaboradores (1987) para leveduras de diferentes isolados, no caso o padrão denominado rápido (em contraposição ao de isolados cujo crescimento foi qualificado de lento e/ou moderado), com o final da fase exponencial em torno do sexto dia. É também semelhante ao observado por Camargo et al. (1988) para o isolado Pb339 com uma fase logarítmica que foi descrita como se iniciando após 24h, podendo estender-se até o décimo ou décimo terceiro dia (Kashino *et al.*, 1987; Camargo *et al.*, 1988).

O diagnóstico etiológico da paracoccidioidomicose e a identificação taxonômica de seu agente se baseiam em dois aspectos principais: a) no achado de células leveduriformes com múltiplos brotamento característicos, tanto nos tecidos do hospedeiro, quanto em espécimes clínicos; b) na observação da sua capacidade de realizar, de modo reversível, a transição dimórfica termo-dependente de micélio a levedura e vice-versa (San-Blas et al., 1992). A ausência destas duas características obrigou à identificação molecular do isolado YRT. Os resultados das análises comparativas das sequências dos produtos de PCR correspondentes às regiões ITS 1/ ITS 4 e NL1/ NL2 dos genes rRNA e do segundo produto da amplificação por *Nested* PCR do gene codificador da gp43 confirmaram que a identidade de gênero e espécie do isolado YRT como *Paracoccidioides brasiliensis* ($\geq 99\%$). Essa identificação teve respaldo também na ausência de amplificação na isolado YRT de marcadores relatados como específicos de *P. lutzii* (região *indel* do gene da Hsp70, Trem E) e, ao contrário, na amplificação de um marcador relatado como específico de *P. brasiliensis* (Trem G), cujo sequenciamento confirmou a identidade do produto cujo alinhamento apresentou vários hits significativos com sequências de Pb18, *P. brasiliensis* S1) (Teixeira et al., 2009; Marini et al., 2010; Alves et al. 2015). É interessante notar que, entre os autores que estudaram isolados atípicos no dimorfismo térmico, Borba e colaboradores (2005) também utilizaram para

identificação o sequenciamento e comparação por alinhamento de sequências do gene codificador da glicoproteína de 43 KDa, antígeno específico de *P. brasiliensis*.

Desde que foi observado o crescimento do isolado YRT em cultivos a 37°C, tornou-se importante verificar se também sobreviveria em animais de experimentação. Tal capacidade foi confirmada por meio da inoculação em camundongos C57BL6/6 com re-isolamento do fungo para avaliação da carga fúngica pulmonar, após três dias de infecção. Não houve recuperação de colônias fúngicas da amostra Pb339 do pulmão dos animais, mas foram recuperadas leveduras viáveis da amostra Pb18, também usada como controle, e do isolado YRT_TA (YRT_25), bem como da YRT_37. Observou-se maior carga fúngica recuperada do pulmão dos animais infectados com a amostra YRT_TA, comparativamente tanto à amostra Pb18 L quanto à isolado YRT_37°C. Um aspecto sugestivo do possível interesse em se estudar mais detalhadamente o padrão da infecção experimental do isolado YRT foi exatamente o achado de diferenças no padrão da resposta inflamatória, com um índice mais elevado, significativo, de neutrófilos nos animais inoculados com a isolado YRT_TA (YRT_25) comparativamente aos animais infectados com a amostra YRT_37_5D e ao grupo de animais não infectados. Contudo, o acúmulo de macrófagos foi mais significativo nos pulmões dos animais inoculados com a amostra Pb18 comparativamente à infecção com a amostra parental Pb339 L, e com a isolado YRT (tanto YRT_TA quanto YRT_37). Entretanto, não havendo dados de mortalidade, as informações disponíveis não são suficientes para avaliar a virulência ou patogenicidade das amostras inoculadas.

Encontrou-se na literatura apenas dois trabalhos que apresentaram dados de infecção experimental de camundongos empregando isolados atípicos, leveduriformes à T.A. No primeiro, Villar e Restrepo (1989) compararam a virulência de uma amostra leveduriforme à T.A, também denominada YRT (ATCC 46678), que foi selecionada por esse fenótipo a partir da germinação de preparações puras de conídios do isolado ATCC 60885, cultivadas na presença de soro fetal bovino, à temperatura ambiente. Os grupos de camundongos foram inoculados por via endovenosa com as amostras parental L (a 37°C) e YRT (ambas com 7 dias de cultivo, 10^7 células viáveis/ 0,1 mL) e com conídios (5×10^5). A caracterização da maior virulência da amostra YRT (ATCC 46678) se revelou por meio da maior perda progressiva de peso corporal, maior aumento do peso dos pulmões e baço dos animais, reisolamento de colônias a partir dos pulmões e baço com maior número de c.f.u/ órgão, doença progressiva e índice de mortalidade de 16,6% nesse grupo (ausência de mortalidade

nos demais). No segundo trabalho, contrariamente ao padrão de maior virulência da descrito por Villar e Restrepo (1989) para a amostra leveduriforme à T.A., Borba e colaboradores (2005) relataram ausência de virulência de 4 amostras de *Paracoccidioides* com o fenótipo leveduriforme à temperatura ambiente, recuperadas após estocagem prolongada sob óleo mineral. Os autores realizaram a inoculação em camundongos BALB/c, comparando com aqueles inoculados com Pb18 e outras amostras com o fenótipo regular. Não houve mortalidade dos animais inoculados com as amostras que apresentavam o fenótipo leveduriforme à T.A. ou lesões perceptíveis nas análises histopatológicas em órgãos internos (Borba *et al.*, 2005). Desenha-se portanto, como bastante interessante a possibilidade futura de realizar-se um estudo semelhante ao de Villar e Restrepo (1989), em função da disponibilidade do isolado Pb339, parental, e do isolado YRT, essa mantida em duas condições, tanto na presença da droga SMZ e na ausência dela, bem como pela disponibilidade no nosso grupo de experiência num modelo de paracoccidioidomicose experimental bem sucedido e bem controlado (Santos *et al.*, 2013).

A documentação gerada por meio de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão mostrou estruturas celulares compatíveis com o usualmente descrito para o fungo (Carbonell e Rodriguez, 1965; Carbonell, 1969). Na isolado YRT confirmou-se a ausência de transição de fases, independentemente da temperatura, leveduriforme, heterogênea e irregular, formas ovoides alargadas e catenuladas com pequenos brotamentos, grumadas, formas semelhantes a pseudo-hifas e ausência das típicas estruturas em “roda de leme”. A observação ultraestrutural do isolado YRT revelou a presença de partículas de glicogênio e vacúolos lipídicos distribuídos ao longo da célula, mitocôndrias concentradas nas regiões periféricas. Não fomos capazes de perceber alterações estruturais expressivas nas micrografias registradas.

Há na literatura descrições dos níveis de quitina na parede celular de *P. brasiliensis* sabendo-se que esta representa em torno de 43% do peso seco da parede das leveduras, enquanto nas hifas compõe apenas 13% da estrutura (Niño-Vega, Munro, *et al.*, 2000; Puccia *et al.*, 2011), sendo este um dos caracteres bioquímicos estruturais distintivos entre a fase micelial e leveduriforme. Com base nisso, realizou-se a determinação do conteúdo de quitina por método fluorimétrico estimando-se a incorporação de calcoflúor em massas celulares derivadas dos isolados Pb339 e Pb18, utilizados como controles, em cultivos micelial e leveduriforme; em massas correspondentes à isolado YRT cultivada à T.A. na ausência e na

presença de SMZ(400µg), e do isolado YRT cultivada a 37°C. Os resultados dos controles Pb18 e Pb339 mostraram diferença significativa no conteúdo de quitina das paredes entre as fases de micélio e levedura. Ao observarmos o gráfico, todos os isolados leveduriformes apresentaram conteúdos mais elevados de quitina, com diferença estatisticamente significativa para a isolado YRT_37_5D e YRT_400. Interpretamos essa diferenciação como uma evidencia bioquímica ou uma confirmação de natureza da condição leveduriforme do isolado YRT.

Um outro aspecto bioquímico pesquisado foi a produção de ROS pelo fato de contar-se entre uma das prováveis diferenças metabólicas entre o micélio e as leveduras de *Paracoccidioides*. A produção de derivados reativos de oxigênio (ROS) seria característica preferencial das leveduras segundo as informações disponíveis sobre o perfil metabólico da fase leveduriforme de *Paracoccidioides*. Marques et al. (2004) comentaram que pelo fato de o desacoplamento da fosforilação oxidativa na transição M-L ser marcada por alterações na respiração e rápido declínio de ATP intracelular (Medoff et al. 1987; Maresca and Kobayashi 2000), o crescimento a 37°C deve dar origem a uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (ROS) em função do aumento da temperatura, o que sugere que os sistemas antioxidantes encontrados em *P. brasiliensis* podem ser extremamente importantes tanto para a sobrevivência no interior de macrófagos mas também para a desintoxicação de ROS. Contudo, os resultados de determinação de ROS nas fases M e L dos isolados controle Pb18 e Pb339 não revelaram um aumento significativo de ROS nas leveduras. Da mesma forma, a isolado YRT_TA mostrou níveis mais elevados mas não revelou diferenças significativas nos níveis de ROS; já a isolado YRT a 37°C e a YRT na presença de SMZ(400µg) apresentaram aumento significativo nos níveis de ROS, o que se pode interpretar como funções do estresse térmico na primeira e do estresse da droga na segunda. É importante citar aqui o trabalho de Zambuzzi e colaboradores (2015) que executaram análise do perfil transcricional de *P. lutzii* em resposta a concentrações sub-inibitórias do sulfametoxazol. Os autores relataram alterações na regulação de genes relacionados a energia e metabolismo, regulação negativa dos genes mitocondriais, redução do ATP mitocondrial, envolvendo um colapso bioenergético causado essencialmente por um decréscimo do nível de ATP mitocondrial. O sulfametoxazol interfere na adequação da mitocôndria e induz super-expressão de genes relacionados à biossíntese de aminoácidos e ácidos nucleicos e à biossíntese de precursores de cofatores de folatos.

Os ensaios realizados para avaliar a influência do meio de cultura foram decisivos para revelar que o fenótipo YRT é provavelmente dependente das condições de cultivo pois alterações nos níveis glicose no meio YPD afetaram a permanência da morfologia leveduriforme na temperatura ambiente e quando se substituiu o meio YPD pelo meio sintético (*yeast nitrogen base*) adicionado ou não de glicose ocorreu a reversão completa do fenótipo YRT observando-se o crescimento de micélio à temperatura ambiente. Paris (1985) estudou vários isolados do fungo do ponto de vista nutricional e verificou que todas as amostras testadas eram prototróficas na fase micelial enquanto a fase leveduriforme era auxotrófica, requerendo algum aminoácido enxofrado (cisteína, cistina ou metionina) para o seu crescimento. Observou, também, que a mudança de fonte de nitrogênio afetava a morfologia das células leveduriformes. Uma fonte de aminoácidos contendo enxofre parece ser essencial para a manutenção da fase leveduriforme de *P. brasiliensis*. A questão da auxotrofia para enxofre orgânico da fase leveduriforme de amostras de *Paracoccidioides sp.* foi retomada por vários autores confirmando que apesar da fase leveduriforme ser auxotrófica para enxofre orgânico a fase micelial, ao contrário, é prototrófica. Abordagens transcritômicas recentes mostraram que genes para enxofre são diferencialmente expressos no micélio e na levedura. Estes trabalhos mostraram a super-expressão de genes como METR (regulador positivo das vias de assimilação de enxofre inorgânico) e SCONC (regulador negativo das vias de assimilação de enxofre inorgânico, cujo produto promove a proteólise de MetRp inibindo as vias de assimilação de enxofre inorgânico) nas leveduras (Marques et al., 2004; Ferreira et al., 2006; Andrade et al., 2006). Assim, os baixos níveis de SCONC permitem que o micélio utilize enxofre inorgânico (ausência de proteólise de MetR). Menino e colaboradores (2013) estudaram o efeito de SconCp, o regulador negativo da via de assimilação do enxofre inorgânico, por meio da modulação da expressão do repressor em linhagens parcialmente silenciadas, implicando a molécula na regulação do dimorfismo a partir da modulação do metabolismo de enxofre inorgânico (Menino *et al.*, 2013).

O transcrito do isolado YRT defectiva para o dimorfismo térmico e a do isolado Pb339 nas suas duas fases morfológicas M e L foi realizado. Esse trabalho representa uma abordagem inédita, por sequenciamento em larga escala NGS, do estudo do perfil de expressão genica desse isolado e sua isolado sob diferentes condições experimentais. Os genomas de referência Pb01, Pb03 e Pb18 tem como uma das principais características a alta sintenia e a segunda versão do sequenciamento está disponível na base de dados do Broad Institute (Desjardins *et al.*, 2011; Muñoz *et al.*, 2014). O isolado Pb339, a mesma do isolado

Pb18 (Matute *et al.*, 2006; Theodoro *et al.*, 2012) possui um genoma haplóide, com um tamanho aproximado de 27.6 Mpb (Cano *et al.*, 1998) enquanto o Pb18v2 apresenta um genoma de 29.95 Mpb e 8.930 genes. Apesar do genoma do isolado Pb339 ainda não ter sido publicado, a disponibilidade do genoma Pb18v2 de *P. brasiliensis* tornou possível a análise da expressão genica tomando-o como referência (Muñoz *et al.*, 2014). O número de genes identificados, 8.011 genes, é um indicativo da consistência da montagem do transcrito, considerando o tamanho estimado do genoma do isolado Pb339. Além disso o preparo das amostras biológicas, desde a extração do RNA total e a preparação das bibliotecas PE, foram essenciais para a geração de dados com alta qualidade e tornando possível a profundidade do sequenciamento. Todas as réplicas biológicas mostraram-se correlacionadas positivamente (CCP>0.78) proporcionando a extração da informação biológica útil e o apoio estatístico nas análises.

Gilmore e colaboradores (2015) utilizando 4 isolados de *H. capsulatum*, pela montagem do transcrito *in silico*, verificaram que em pelo menos 2% do seu transcrito, a reprogramação da arquitetura gênica é termo-dependente, portanto fase específica (Gilmore *et al.*, 2015). Dessa forma, a montagem *de novo* do transcrito representa uma abordagem importante no estudo das fases L e M de *P. brasiliensis*, no contexto da análises de novas isoformas e da arquitetura gênica desse isolado, ainda pouco explorada.

A anotação funcional dos transcritomas foi realizada pela integração dos dados disponíveis para o genoma Pb18v2. O número de produtos gênicos anotados como hipotéticos disponível na base de dados do Broad Institute foi de 88% (7395/8390) e desses, 40% (2941/7395) não possuem anotação de domínios funcionais (Pfam), nessa última versão. Além do Pfam (v27), a anotação funcional também incluiu a integração das informações Gene Ontology (GO), vias metabólicas e domínios (Kegg-v65), regiões domínios de transmembrana (HMM) e peptídeo sinal (SignalP). Por outro lado, a análise com a anotação fornecidas pelo Pfam e GO, apesar de informativas, foram dificultadas pela pouca uniformidade de termos anotadores dos produtos gênicos encontrados na literatura, principalmente antes da primeira versão dos genomas de *Paracoccidioides* (2011), cuja base de dados referência utilizada é o NR do NCBI. Contudo, observou-se no NR a existência de dois ou mais GIs (*GenInfo Identifier*) e números de acessos (accession) diferentes para um mesmo gene da versão 2 do genoma de Pb18. Dessa forma uma estratégia adicional foi adotada, para adicionar pistas a anotação funcional pela base de dados NR. Essa estratégia de

reanotação genômica e integração de dados gerou um *pipeline* de análises cujo o produto final é um arquivo em formato texto tabular, factível de ser aberto em planilha excell e de visualização amigável. As informações associam o produto gênico, GI e accession number do NCBI, ao Broad Id e demais informações fornecidas pelo genoma Pb18v2. Essa estratégia conferiu um aporte maior para as análises e uma referência para as buscas na literatura. Vale a pena pontuar que um aspecto importante que adicionaria contribuição seria também a integração da anotação dos genomas de Pb01 e Pb03 para o Pb18 por ortologia, considerando a alta sintenia entre eles, e tomando como base principalmente, o genoma de Pb01 com o maior número de anotações acuradas e validações experimentais, por se tratar da espécie mais estudada do complexo *Paracoccidioides*.

A introdução de estratégias de sequenciamento profundo no estudo de transcritomas de fungos, mudou drasticamente o panorama e o entendimento do perfil de expressão genica desses organismos. Tavares e colaboradores (2015) fazem uma revisão dos transcritomas do complexo *Paracoccidioides* mostrando as abordagens tradicionais utilizadas (sequenciamento de ESTs por Sanger, Microarranjos, SAGE, CAGE, RDA) (Felipe *et al.*, 2003; Goldman *et al.*, 2003; Felipe, Andrade, *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2005) e faz menção à necessidade de se expandir os estudos aplicando a tecnologia de sequenciamento RNASeq para explorar o transcritoma desse organismo, já que é uma ferramenta poderosa para auxiliar nos estudos de biologia de sistemas (Tavares *et al.*, 2015). Em *Paracoccidioides* o uso de abordagens de sequenciamentos de alta resolução (RNASeq) é recente. Ressaltando o trabalho de Lima e colaboradores (Lima *et al.*, 2014), adotando a Biologia de Sistemas integrou diferentes níveis de regulação genica de Pb01 (*P. lutzii*) através das análises do transcritoma e do proteoma frente a privação de carbono. Vale a pena comentar que os estudos das vias metabólicas de assimilação de zinco e ferro das espécies *P. lutzii* (Pb01) e *P. brasiliensis* (Pb18) (Bailão *et al.*, 2015), e os estudos dos efeitos do antifúngico *Argentilactone* na resposta transcricional relacionada aos genes da parede celular e do estresse oxidativo de *Paracoccidioides spp* (Araújo *et al.*, 2016). Adicionalmente, Goldman e colaboradores (Goldman *et al.*, 2003) em um dos primeiros trabalhos que envolveram a análise em larga escala do transcritoma nas fases do transitória L→M e M→L de *P. brasiliensis* (Pb18), pontua a necessidade da dissociação da morfogênese transitória nas análises do transcritoma e a importância de se obter um isolado que não apresentasse o dimorfismo térmico a TA, permanecendo na forma leveduriforme nessa condição (Goldman *et al.*, 2003).

No presente trabalho a integração dos dados pela abordagem *knowledge-base*, um conceito da biologia de sistemas, foi aplicado integrando técnicas microbiológicas, bioquímicas e de bioinformática para modelar a dinâmica multifatorial do dimorfismo térmico. Dessa forma as análises comparativas entre os genes diferencialmente expressos do isolado YRT e os do isolado Pb339 nas fases L e M foi realizada. O estudo comparativo nessa ótica, representa um trabalho inédito e indispensável para o estudo do dimorfismo térmico, no contexto da biologia de sistemas desse fungo.

O transcrito das fases definidas L e M apresentaram regulação genica fase-específica bem definida no isolado Pb339. O número de genes diferencialmente expressos na fase L foi menor do que na fase M. Genes do core transcrito de *P. brasiliensis* preferencialmente expressos na fase L foram identificados nas análises. Os genes do antígeno imunodominante gp43 e o gene *ags1* (alpha-1,3-glucan *synthase*), uma glucana da parede celular, envolvidos na virulência e no processo metabólico de carboidratos foram identificados (Cisalpino *et al.*, 1996; Sorais *et al.*, 2010; Tomazett *et al.*, 2010). Adicionalmente, o gene que codifica a proteína p27 kda responsável pela sobrevivência e escape do sistema imunológico do hospedeiro (Torres *et al.*, 2014) e o *hsp60*, uma chaperona mitocondrial, envolvida no estresse oxidativo e na resposta imune protetora do hospedeiro foram observados como regulados positivamente (Bastos *et al.*, 2007; Tavares *et al.*, 2007; Bastos *et al.*, 2008). O fator de transcrição contendo o domínio *ryp2* (família Velvet fator - PF00172.13), ortólogo de *H. capsulatum* e *B. dermatitidis* apresentou-se super-expresso ($\log_{2}FC > 5$). Tal gene foi descrito como envolvido na formação do complexo *ryp*, com função na regulação dos genes de patogenicidade e com indicativo de regulação da morfologia e crescimento da levedura de *H. capsulatum* a 37° C (Webster e Sil, 2008; Beyhan *et al.*, 2013).

Os genes mais representados nesse transcrito estão relacionados ao processo metabólico de oxidação redução (GO:0055114), especialmente os genes envolvidos na via *ubiquinol-cytocromo-c-reductase* (EC1.10.2.2). Tais genes atuam no terceiro complexo da cadeia respiratória presente na mitocôndria. Outro aspecto interessante foi que apenas dois genes contendo o domínio catalítico ADH_N (Alcohol dehydrogenase GroES-like domain - PF08240.7) foi identificado como diferencialmente expresso, desses apenas um gene mostrou-se com expressão aumentada ($\log_{2}FC > 4$). Entretanto, um grupo de genes envolvidos na via β -oxidativa associados metabolismo de lipídeos, também foram identificados como diferencialmente expressos. Nunes e colaboradores, nas análises do transcrito de Pb18,

sugeriram que a levedura desse isolado possuía diferenças na via de fermentação (Nunes *et al.*, 2005). Na análise comparativa que envolveu o proteoma do isolado Pb339, identificaram-se genes com expressão induzida envolvidos também na via β -oxidativa (Pigosso *et al.*, 2013). Nos nossos achados por microscopia é possível identificar grandes vacúolos de lipídeos na levedura do isolado Pb339. Esses achados juntamente com a análise da expressão genica são pontos marcantes que confirmam a hipótese de que a levedura desse isolado também utiliza, preferencialmente, a via de degradação aeróbica de lipídeos para a produção de energia.

Outro aspecto importante apresentado foi o enriquecimento da via de estresse oxidativo. Os genes para catalaseB e *Cu Zn superoxide dismutase* SOD3 (Copper/zinc superoxide dismutase SODC, PF00080.15), ortólogos aos fungos *B. demartitidis* and *H. capsulatum*, são descritos como importante na resposta da levedura ao estresse oxidativo provocado por macrófagos do hospedeiro, apresentaram-se superexpressos ($\log_{2}FC > 4$) na levedura (Dantas *et al.*, 2008; Gilmore *et al.*, 2015; Tamayo *et al.*, 2016). Além disso o gene 4-HPPD da família de proteínas *dioxygenase*, visto como um dos genes envolvido na morfogênese M \rightarrow L em *P. brasiliensis* apresentou-se regulado positivamente nessa fase (Nunes *et al.*, 2005).

Em micélio o gene hidrofobina (Pbhyd1) descrito como preferencialmente expresso nessa fase e tido como um importante fator de crescimento, virulência e infecção, foi identificado como altamente expresso ($\log_{2}FC > 8$) (Felipe *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2004). Dois genes não menos importantes mostraram-se induzidos nessa fase: o gene *gln1* que codifica a enzima *glutamine synthetase* envolvido na biossíntese da parede celular (Zambuzzi-Carvalho *et al.*, 2015) e os genes *had32* e *badh* mostraram-se induzidos no transcrito da fase M. O primeiro gene (*had32*) contém o domínio funcional HAD_2 (haloacid dehalogenase-like hydrolase - PF13419.1), uma adesina exclusiva de fungos dimórficos e filamentosos patogênicos, é considerada um fator de virulência ativo durante a interação inicial entre as células do fungo e a do hospedeiro (Hernández *et al.*, 2010; Satpathy *et al.*, 2015); Já o gene *badh*, uma *betaine aldehyde dehydrogenase* (Aldehyde dehydrogenase Family – PF00171.17) descrito como um gene relacionado a adaptação desse organismo sob a pressão de antifúngicos, como o itraconazol, mostrou-se regulado positivamente (Da Silva Neto *et al.*, 2014).

Os termos anotadores envolvendo os processos biológicos oxiredução e carreadores de elétrons foram identificados como enriquecidos. Destacam-se os genes codificadores das

proteínas da superfamília *cytochrome* P450 (p450 - PF00067.17). Drogas derivadas de azoles, como itraconazol, agem bloqueando a via de biossíntese de ergosterol inibindo a enzima ERG11 (*cytochrome* P450 *ergosterol demetilase*). Os genes relacionados a esses processos encontraram-se induzidos ($\log_{2}FC \sim 2$), mas não apresentam padrões de super-expressão nessa fase, corroborando os resultados experimentais desse trabalho para quantificação dos níveis de ROS, onde pôde-se verificar o mesmo padrão.

Ao contrário da levedura, vários genes contendo o domínio *Alcohol dehydrogenase* GroES-like apresentaram super-expressão na forma micelial. Nos estudos fase específica do transcrito do complexo *Paracoccidioides* as análises relacionadas aos processos bioenergéticos sugerem um favorecimento do metabolismo aeróbico no micélio e fermentativo na levedura (Felipe, Andrade, *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2006). Contudo, nossos resultados corroboram as observações prévias na literatura envolvendo respiração celular, mostrando que a respiração aeróbica e anaeróbica pode ocorrer em ambas as fases morfológicas desse organismo (Bandeira e Nóbrega, 2008; Martins *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2011).

A atividade de transporte e de transporte de transmembrana, envolvendo macro ou pequenas moléculas ou íons também se mostraram super-representadas no transcrito do micélio. A destacar os genes codificadores de proteínas contendo os domínios ABC transporter (PF00005.22) e MFS_1 (Major Facilitator Superfamily - PF07690.11). Dentre os genes de transporte ABC, os que contem domínios adicionais ABC_2 (PF01061.19), ABC_membrane (PF00664.18 transmembrane) apresentaram super-expressão. Genes contendo domínios adicionais ao MFS_1 como o domínio *Sugar_tr* (PF00083.19) relacionado ao transporte de carboidratos e também domínios TRI12 com função de bomba de efluxo em fungos (*Fungal trichothecene efflux pump* - PF06609.8) mostraram altamente expressos com o valor de $\log_{2}FC$ variando entre 3 a 8 vezes. Nos estudos de Zambuzzi-Carvalho e colaboradores (2015) amostras de leveduras de *Paracoccidioides* expostas ao potencial antifúngico oenothien B, apresentaram super-expressão dos genes contendo o domínio MFS, mas não dos genes ABC transportes (Zambuzzi-Carvalho *et al.*, 2015). Em outros fungos como *S. cerevisiae* e *Candida spp.*, são frequentemente observados super-expressão desses genes quando essas células são expostas a antifúngicos. Esse fenômeno na presença de drogas, levam ao efeito como “resistência a multidrogas” (*multidrug resistance*) (Vermitsky e Edlind, 2004). Drogas derivadas de azoles, como fluconazol, também tem

efeito nessa via de transporte. Nesse cenário, genes mostrando super-expressão na fase M, também podem representar potenciais alvos de estudos de novas drogas e vacinas com ação inibitória. Incluídos dentro da categoria funcional *carbon-sulfur lyase activity*, múltiplas cópias do gene *gfa* contendo o domínio catalítico *Glutathione-dependent formaldehyde-activating enzyme* (PF04828.9) apresentaram-se enriquecidos. Dos 5 genes encontrados, 2 apresentaram super-expressão ($\log_{2}FC > 4$ e $\log_{2}FC > 5$) e os demais apresentaram-se induzidos ($\log_{2}FC \sim 2$). Enzimas da família glutationa, são multifuncionais com papel central na detoxificação e secreção celular de uma grande variedade de compostos xenobióticos (Da Silva Neto *et al.*, 2014). No caso das enzimas com o domínio GFA, estudos realizados no organismo *Paracoccus denitrificans*, uma bactéria conhecida por sua característica denitrificante redutora, tem a função de catalisar o primeiro passo da via de detoxificação de formaldeído (Baumann *et al.*, 1996). Entretanto, há carência de estudos voltados para o essa enzima específica em fungos.

Esse trabalho, representa a primeira iniciativa de análise por sequenciamento profundo RNASeq, fase específica, para a obtenção do panorama transcricional da fase M de *P. brasiliensis*, isolado Pb339. Sem dúvida, uma contribuição valiosa por expor o mapa transcricional detalhado dessa fase, apontando genes ainda não identificados como preferencialmente expressos. Ainda, um número 3 vezes maior de genes diferencialmente expressos foi identificado, com relação a fase L. Aproximadamente metade desses genes, incluindo os anotados como hipotético, mostraram-se induzidos, com valores de expressão variando entre $3 > \log_{2}FC < 12$. Dessa forma, uma análise cuidadosa é requerida pelo volume de dados apresentado.

Os genes diferencialmente expressos do isolado YRT cultivada a 37° C por 5 dias foi comparado com a forma L do isolado Pb339 nas mesmas condições. Destaca-se o gene que codifica a proteína formamidase, da família *FmdA_AmdA (Acetamidase/Formamidase Family* - PF03069.10), importante no metabolismo de nitrogênio (ko00910). Pigozzo e colaboradores (2013) comparou os perfis proteômicos dos isolados Pb01 (01-like), Pb2 (PS2), Pb339 (S1) and PbEPM83 (PS3) na forma L, por eletroforese 2D e espectrometria. Com relação a esse gene específico, o proteoma de Pb01 apresentou uma isoforma dessa proteína com níveis de expressão aumentadas ($FC \sim 5x$), com relação aos demais isolados (Pigozzo *et al.*, 2013). Nossos dados apresentam o mesmo gene, homólogo a Pb01, com níveis de expressão aumentados ($\log_{2}FC \sim 3$) nessas condições. O gene de transporte de

potássio (K⁺ potassium transporter - PF02705.11) (kup: potassium uptake protein - TIGR00794) foi identificado como induzido. Andrade e colaboradores (2006) pontuam que tais genes estão associados aos mecanismos de resistência do fungo durante a privação de K⁺. Além disso, considerando que o nicho desse organismo é o solo, essas proteínas podem atuar como reguladoras do gradiente de concentração celular, permitindo a sua adaptação em ambientes com maiores ou menores concentrações de K⁺ (Andrade *et al.*, 2006).

Em contraste, a isolado YRT a 37°C, apresentou vários processos biológicos com empobrecimento de função significativo (q-value<0.005). Vale a pena destacar que apenas 5 dos 442 genes associados a expressão genica, foram identificados, dentre eles, o gene que codifica o fator de transcrição fungo específico com domínios adicionais *zinc finger* (PF04082.13, PF13894.1, PF00096.21, PF13465.1) que se mostrou super-expresso (logFC~7), indução de outros 2 genes com estruturas de domínios similares (PF00172.13). Todd e colaboradores (2014) apresentam um estudo global sobre a prevalência de fatores de transcrição com função regulatória específica em fungos. Utilizando culturas de fungos filamentosos em fase exponencial, foram identificadas diferenças significativas entre o repertório de regulação gênica ascomicota e basideomicota. Em ascomicetos (espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, por exemplo) os domínios mais representativos foram Zn2Cys6 (PF00172), o domínio regulador Fungal-specific (PF04082) e C2H2 (PF0096) (Todd *et al.*, 2014). O empobrecimento dessa função pode refletir o fato de que essas células dessa isolado atingem a fase estacionária mais cedo do que o isolado Pb339, como observado na curva de crescimento dessa linhagem, contudo tal aspecto precisa ser investigado com maiores detalhes. Adicionalmente, o processo biológico de biossíntese celular mostrou-se também sub-representado. Destacam-se a presença de 2 fatores de transcrição induzidos (logFC~2): o primeiro contendo o domínio Myb_DNA-bind (PF13921.1) e o segundo o domínio HMG_box (PF00505.14), ambos envolvidos na regulação de processos dependentes de DNA, tais como transcrição, replicação e reparo de DNA. Em especial o gene MAT1-2, citado por Teixeira e colaboradores (2013), que contem o domínio para o fator de transcrição HMG_box, que segundo os autores, confere identidade sexual aos organismos haplóides e, portanto, reprodução sexuada (Teixeira *et al.*, 2013). Os autores ainda relatam que tal gene, juntamente com o gene MAT1-1 são preferencialmente expresso na fase inicial M de *Paracoccidioides* ssp. A isolado YRT a 37° C apresenta-se morfológicamente como uma levedura, apesar de ter como característica a capacidade de se aderir fortemente ao meio de cultivo a 37° C, assim

como as hifas a TA desse fungo, contudo, não foram identificados estruturas similares às mostradas pelos autores e nem indução de genes relacionados a adesão celular.

A super-expressão ($\log_{FC} \sim 4$) do gene contendo o domínio GroES-like, uma álcool desidrogenase (EC:1.1.1.1) e a indução de outros genes contendo o domínios adh_short_C2 e ADH_zinc_N (Enoyl-(Acyl carrier protein) reductase - PF00106.20, Zinc-binding dehydrogenase - PF00107.21) representam um indicativo de que essa isolado nas mesmas condições de crescimento da L do isolado Pb339, tende preferencialmente obter fontes de energia pela via β -oxidativa. Além disso, nas análises de microscopia ótica e eletrônica, é possível identificar a presença de grandes vacúolos lipídicos, suportando essa hipótese.

Outro aspecto importante é que apesar de não apresentarem enriquecimento funcional, pelo menos 11 genes apresentando domínios funcionais relacionados à via estresse oxidativo foram identificados. Desses, 4 genes (PF00067.17, PF01179.15, PF07732.10) altamente expressos, destacando o gene *fre3* (PF08022.7, PF08030.7, PF01794.14) com domínio *ferric reductase like transmembrane component*, que codifica uma metaloprotease homóloga a *S. cerevisiae* e *C. albicans* ($3 > \log_{FC} < 6$) (Silva *et al.*, 2011) e outras 7, como CAT1 (K03781), apresentaram-se induzidas, corroborando o nosso ensaio experimental ROS. Nesse contexto, o que tudo indica é que, nessas condições, tais genes estão potencialmente envolvidos nos mecanismos de detoxificação celular.

Os genes diferencialmente expressos do isolado YRT, com 15 dias de crescimento, incubados à TA, quando comparada ao micélio nas mesmas condições experimentais, apresentou a via de transdução de sinais, envolvendo as proteínas quinases, enriquecidas significativamente ($q\text{-value} < 0.05$). Foram 21 genes identificados nessa via e, dentre eles, 9 contendo anotação funcional relacionada ao domínio *protein kinase* (PF00069.20), domínios *protein kinase* (PF00069.20) associadas ao domínio *protein tyrosin kinase* (PF07714.2) e uma *choline kinase* (*choline/ethanolamine kinase* Family - PF01633.15) em conjunto com o domínio APH (*phosphotransferase enzyme Family* – PF01636.18). *Ethanolamine* e *choline* compõem os maiores fosfolípidos de membrana (*glycerophosphoethanolamine* e *glycerophosphocholine*). A *Ethanolamine* é um componente das ancoras de GPI, importantes para adesão da superfície celular de microrganismos, enquanto a *choline* foi descrita como importante para o crescimento de fungos filamentosos e com papel regulador da morfologia do micélio (Markham *et al.*, 1993). Um conjunto de 4 genes anotados como hipotéticos, mas

com termos anotadores GO relacionados a atividade kinase, mostraram-se com expressão aumentada ($3 > \log_{2}FC < 4$), os demais genes apresentaram-se induzidos ($\log_{2}FC \sim 2$).

Genes envolvidos na via oxireductase também mostraram-se enriquecidos na isolado YRT a TA com 15 dias de crescimento. Destacando 2 genes contendo o domínio GroES-like, já descrito nesse trabalho como envolvido na no metabolismo de gliceralipídeos (ko00561), na lipídeos (ko00071) e no metabolismo de drogas (ko00982), 2 genes contendo o domínio Aldo_ket_red (PF00248.16), ambos também envolvidos no metabolismo de ácido linoleico (ko00591). Outros genes associados a via β -oxidativa foram encontrados induzidos.

Em contraste com outras condições, com 5 dias de crescimento a TA, a isolado YRT apresentou enriquecido o termo anotador *cofator bind*, chamando atenção para 4 genes contendo em comum o domínio AMP-binding (PF00501.23) e 2 genes apresentando o domínio Adenosine/AMP deaminase (PF00962.17), conservado em todos os organismos, consideradas peças-chave para o metabolismo de purinas.

Na análise em larga escala de potenciais regiões variantes do isolado parental Pb339 não se identificou regiões gênicas contendo mutações. Considerando que esse isolado apresenta o dimorfismo térmico quando submetido às condições de temperatura de 37°C e/ou a TA, e que a isolado YRT derivou desse isolado, tal resultado pode ser considerado consistente. Contudo, na isolado YRT, 6 genes foram identificados com mutações relacionada a perda de função e também de ponto não-sinônima. O gene contendo o domínio funcional Usp (*Universal stress protein Family* - PF00582.21) é conservado em diversos organismos como bactérias, fungos e plantas. Bem explorada em bactérias, mas carente de estudos em fungos, as proteínas USP são capazes de responder a condições de estresses variadas, tais como: choque térmico, privação de nutrientes, estresse oxidativo, agentes que danificam o DNA ou outros agentes que podem afetar o crescimento celular. Dessa forma essas proteínas são tidas como uma defesa natural desses organismos (Tkaczuk *et al.*, 2013). Em bactérias mutantes para os genes usps, o crescimento frente a níveis baixos de pH e estresse oxidativo e sobrevivência dentro de macrófagos, mostrou-se comprometida em *Listeria monocytogenes* (Seifart Gomes *et al.*, 2011). Nossas análises demonstram que esse gene é homólogo com *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* e, dessa forma, tem o potencial de regular a resposta desses fungos frente a variações de temperatura. Entretanto maiores estudos são necessários para confirmar tal hipótese.

Outro gene com perda de função apresentou os domínios repetitivos tetratricopeptídeos, identificado em Pb01 como transportador de K⁺ (Lima *et al.*, 2014), associado ao domínio Glycosyl transferase (PF13844.1|Glyco_transf_41), com função enzimática que catalisa a adição de *O-linked beta-N-acetylglucosamine* (O-GlcNAc) para resíduos de treonina e serina. Essa enzima atua com exclusividade no núcleo e no citoplasma de organismos eucariotos, incluindo fungos filamentosos. A função do domínio O-GlcNAc em mamíferos aponta seu papel importante na ativação da transcrição através da interação O-glicosídica entre proteínas com atividade de ligação com DNA (protein DNA binding), por exemplo, RNA polimerase II. Em fungos filamentosos, estudos aprofundados são necessários ainda, entretanto, essa mesma atividade em potencial, foi sugerida para *Aspergillus oryzae*, um fungo filamentoso (Machida e Jigami, 1994).

Com relação a mutações de ponto não sinônimas, um gene que codifica a proteína MAP3K (MAPKinase kinase kinase), componente de ativação da via de transdução de sinal das MAPKinases, contendo as assinaturas *kinase-like* (PF14531.1), *protein kinase domain* (PF00069.20) e *protein tyrosine kinase* (PF07714.12), envolvida na via de ativação *mitogen-activated protein kinase kinase kinase* (EC:2.7.11.25). A sequência de ativação da cascata de MAPKinases representam a maior via de controle transcricional em eucariotos. As cascatas de MAPKinases orquestram respostas para diferentes estímulos ambientais. Em *C. albicans* subunidades cataíticas de PKA são conhecidos como ativadores transcricionais de hifas. Em *P. brasiliensis*, existem evidências que cAMP pode inibir o processo de filamentação desse fungo (Paris *et al.*, 1985). O envolvimento de componentes da via de sinalização cAMP/PKA sugere o mecanismo cAMP associado a transição L→M (Fernandes *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007).

O segundo gene contendo 3 domínios MOR2-PAG1 (Cell morphogenesis) conservados em espécies dos gêneros *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Emmonsia*, também apresentou uma mutação não sinônima na região codificadora desse gene. Em *S. cerevisiae* e *C. albicans* foi demonstrado que esta proteína está envolvida na polaridade celular e na morfogênese da hifa (Jorgensen *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2008).

Certamente, os genes encontrados na isolado YRT contendo mutações são genes de potencialmente interessantes. Além disso não descarta-se a possibilidade de existirem mutações em regiões promotoras de outros genes, já que nessa análise apenas as mutações genicas foram analisadas.

Finalizando, assim como as duas fases morfológicas L e M do complexo *Paracoccidioides* apresentam genes preferencialmente expressos fase-específica, reforçadas nesse trabalho, a isolado YRT apresentou um alto número de genes que se mostraram induzidos apenas nessa linhagem. Essas análises representam a primeira iniciativa de uma análises comparativa do transcrito fase-específica de *P. brasiliensis* por NGS e também de uma isolado que não apresenta morfogênese completa, mantendo-se na forma L independente das condições de temperaturas. Estudos associados a morfogênese desse fungo vem sendo explorados em níveis transcricionais, mas no contexto da biologia de sistemas, tais análises são ainda é recentes. O dimorfismo térmico é um mecanismo complexo e multifatorial no *Paracoccidioides*, estudos que envolvem a análise integrativa de dados “omicos” em diferentes níveis do sistema biológico tem o potencial de contribuir para o entendimento dos mecanismos associados a esse evento biológico, bem como o trazer à luz mecanismos envolvidos na patogenicidade desse fungo. A análise exploratória dos dados mostrada nesse trabalho, requerem ainda uma extensiva dedicação sob a ótica de mineração de dados e o entendimento das informações biológicas aqui apresentadas. Tais análises representam um desafio no contexto da biologia de sistemas para a extração da informação biológica útil das múltiplas faces que o transcrito desse organismo apresenta.

A. APÊNDICE

I. Basecalling – Sequenciamento de Sanger

A chamada de qualidade dos dados (*basecalling*), a montagem e a geração das sequências consenso foram realizadas pelo pacote Phred Phrap Consed (PPC) (Ewing e Green, 1998). Considerou-se um valor de qualidade Phred ≥ 20 , que representa um valor de confiança de 99% (Tabela 4). O algoritmo Phred realiza a transformação de cromatogramas (*traces*), provenientes do sequenciador, em arquivos contendo sequências de DNA. O programa *Phred* compõe e associa um fator de qualidade (*Q Phred*) para cada base sequenciada e uma tabela de valores (Tabela 20) é acessada contendo uma medida de qualidade correspondente a probabilidade de erro do *basecall* representado pela equação 1:

Equação 1

$$Q = -10 \times \log_{10}(p)$$

Onde Q é o valor de qualidade *Phred* e p é a probabilidade de erro estimado para aquela *basecalling*.

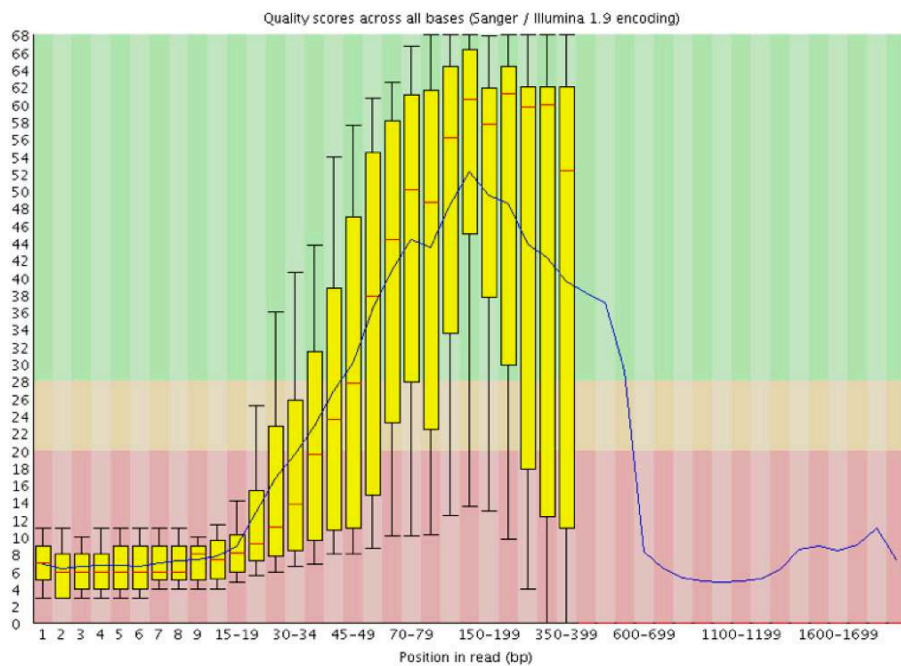
Tabela 20. Escala de valores de qualidade *Phred* (Q)

Q	P	Confiança (%)
10	1 em 10	90,00
20	1 em 100	99,00
30	1 em 1.000	99,90
40	1 em 10.000	99,990
50	1 em 100.000	99,9990
60	1 em 1.000.000	99,99990

Q = qualidade Phred

P = probabilidade de erro

Avaliação da qualidade por base sequenciada. O eixo da abscissa (x) apresenta a posição de cada read sequenciada; eixo da ordenada (y) apresenta a qualidade Phred; os retângulos em amarelo representam o intervalo inter-quartil (25-75%); as linhas em vermelho representam o valor médio; as barras em preto (acima e abaixo) representam o desvio padrão e; a curva em azul representa a qualidade média das bases. Software FastQC.



II. Formato de sequencias biológicas: Fasta e FastQ.

Os principais formatos de arquivo texto utilizados nas análises foram os formatos texto de sequências biológicas fasta e o fastq. O formato fasta contém 2 linhas, onde a primeira inicia-se com o sinal de “>” e um cabeçalho descritivo breve, ou um código identificador da sequência e a segunda linha apresenta a sequência biológica, podendo ser de nucleotídeos ou de aminoácidos (Figura 5A). O formato fastq contém além das sequencias biológicas, que são nucleotídeos geralmente, o score de qualidade correspondente a cada base sequenciada. Esse formato apresenta 4 linhas iniciando pelo “@” seguido do identificador da sequência, a segunda linha contém os dados brutos das sequências biológicas, na terceira linha o sinal “+” é opcional, podendo vir ou não acrescido da mesma informação do cabeçalho e a última linha contém os caracteres associados a qualidade Phred das bases (Figura 5B) (Cock *et al.*, 2010). Ambos os formatos estão apresentados em código ASCII (*American Standard Code for Information Interchange*), um código numérico comum e padronizado, utilizado para representar caracteres interpretáveis por computadores e editores de texto, que utiliza uma escala 0 a 127 onde de 0 a 31 são caracteres de controle de função ou de equipamento (exemplo: CTRL+C) e de 32 a 126 (95 caracteres) representam caracteres que podem ser impressos (exemplo: SHIFT+2 imprime @, etc).

III. Trimmomatic software

Parâmetros e linhas comandos utilizados para o controle de qualidade do sequenciamento RNA-Seq

Painel II. Linha de comando e parâmetros do programa Trimmomatic

```
java -jar trimmomatic-0.35.jar PE -phred33 <input_R1.fq.gz> <input_R2.fq.gz>  
<output_R1_paired.fq.gz> <output_R1_unpaired.fq.gz> <output_R2_paired.fq.gz>  
<output_R2_unpaired.fq.gz> ILLUMINACLIP:TRUESeq-PE.fa:2:30:10:6
```

Onde o parâmetro de corte de adaptadores ILLUMINACLIP e os argumentos TRUESeq-PE.fa:2:30:10:6 representam: TRUESeq-PE.fa arquivo no formato fasta contendo as sequencias dos adaptadores Illumina; 2 (*seed mismatches*) é o número máximo de bases desiguais (*mismatch*) permitidas na semente do alinhamento; 30 (*palindrome clip threshold*) especifica a acurácia de igualdade (*match*) entre as bases dos dois adaptadores PE; 10 (*simple clip threshold*) especifica a acurácia de igualdade (*match*) entre as bases dos adaptadores e das leituras (*reads*); 6 (*min adapter length*) especifica o tamanho mínimo do adaptador (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>).

IV. PrinSeq software

Parâmetros e linhas comandos utilizados para o controle de qualidade do sequenciamento RNA-Seq

Painel III. Linha de comandos do programa PrinSeq

- **Estatísticas do sequenciamento:**

```
perl prinseq-lite.pl -verbose -fastq input_R1.fq.gz -fastq2 input_R2.fq.gz -
graph_data test.gd -out_good null -out_bad null
```

- **Corte de qualidade**

```
perl prinseq-lite.pl -verbose -fastq input_R1.fq.gz -fastq2 input_R2.fq.gz -
min_len 90 min_qual_mean 25 -ns_max_p 1 -lc_method entropy -lc_trashold 50 -
trim_tail_left 4 -trim_tail_right 4 -trim_qual_tipe mean -trim_qual_rule lt -
trim_qual_window 4
```

A estatística do sequenciamento foi realizada por amostragem e o parâmetro “-graph_data” tem a função de gerar os gráficos e estatísticas para inspeção visual das informações relacionadas ao número de leituras sequenciadas, número de bases e qualidade, distribuição do conteúdo GC, etc; - out_good null e -out_bad null prevê a geração de novos conteúdos (*outputs*) que poderiam sobrescrever os dados originais (<http://prinseq.sourceforge.net/manual.html#QC>).

Parâmetros de corte de qualidade: -min_len 90 filtra sequencias mantendo aquelas com tamanhos ≥ 90 ; min_qual_mean 25 filtra sequencias com o valor de qualidade média < 25 (Phred); -ns_max_p 1 filtra sequencias contendo mais de 1% de n; -lc_method entropy método para filtragem de sequencias de baixa complexidade; -lc_trashold 50 valor usado para filtrar as sequencias de baixa complexidade pelo parâmetro entropia < 50 ; -trim_tail_left 4 -trim_tail_right 4 corta a cauda Poli-A a partir do tamanho mínimo de 4 bases a esquerda e a direita das leituras; -trim_qual_tipe mean é tipo de cálculo de pontuação (*score*) foi aplicado, nesse caso a média; -trim_qual_rule lt regra de comparação do cálculo de pontuação relativa a qualidade, nesse caso menor que (*less then*); -trim_qual_window 4 é o tamanho da

janela deslizante para se calcular a média do valor de qualidade (<http://prinseq.sourceforge.net/manual.html#QC>).

APÊNDICE V

V. Trinity pipeline

Painel IV. Linha de comando para a preparação do genoma de referência para montagem, Trinity pipeline

```
$TRINITY_HOME/util/align_and_estimate_abundance.pl          --transcript
Pb18_genes_100flank.fa --seqType fa --est_method RSEM --aln_method bowtie2 --
gene_trans_map ../Pb18_mapping.txt --prep_reference --SS_lib_type RF --
gene_trans_map Pb18_mapping.txt
```

1. Painel V. Linha de comando para a o alinhamento e a estimativa da abundância Trinity pipeline

```
$TRINITY_HOME/util/align_and_estimate_abundance.pl          --transcript
Pb18_genes_100flank.fa --seqType fq --left all_reads_R1.fq.gz --
right all_reads_R2.fq.gz --est_method RSEM --aln_method bowtie2 --
SS_lib_type RF --gene_trans_map Pb18_mapping.txt
```

Painel VI. Linha de comando para análises de diferença de expressão utilizando o pacote Trinity

```
$TRINITY_HOME/Analysis/DifferentialExpression/run_DE_analysis.pl          --matrix
Pb18_genes-v2.counts.matrix --method edgeR --samples_file sample_described.txt
```

O parâmetro `--matrix` irá gerar um arquivo de saída (*output*) com o nome `Pb18_genes-v2.counts.matrix` que contem a contagem bruta das leituras e seus respectivos valores de FPKM não normalizados; `--metodo` modelo BN (EdgeR); `--sample_file` se refere a um arquivo de entrada (*input*) indicando as relações entre as réplicas biológicas.

Painel VII. Análise relativa entre a diferenças de expressão gênica

```
$TRINITY_HOME/Analysis/DifferentialExpression/analyze_diff_expr.pl --matrix  
../Trinity_trans.TMM.EXPR.matrix -P 1e-3 -C 2 --samples ../sample_described.txt
```

VI. Quantificação do RNA pela plataforma *Bioanalyzer*Tabela 21. Avaliação precisa da integridade (RIN) e quantificação do RNA total pela plataforma *Bioanalyzer*

Amostras	Morfologia	Condição (°C)	ID das amostras	Quantificação (ng/uL)	Valor de RIN
PbB339	L	37° C	B339_5D_A	147	6.60
	L	37° C	B339_5D_B	191	7.30
	L	37° C	B339_5D_C	167	6.60
	M	TA	B339_15D_A	87	6.90
	M	TA	B339_15D_B	84	6.80
	M	TA	B339_15D_C	115	6.90
YRT	L	37° C	YRT_37_5D_A	231	7.00
	L	37° C	YRT_37_5D_B	223	7.00
	L	37° C	YRT_37_5D_C	215	7.00
	L	TA	YRT_25_5D_A	165	6.80
	L	TA	YRT_25_5D_B	191	6.80
	L	TA	YRT_25_5D_C	167	7.10
	L	TA	YRT_25_15D_A	164	6.50
	L	TA	YRT_25_15D_B	280	6.60
	L	TA	YRT_25_15D_C	355	6.70

L = levedura

M = micélio

ng/uL = nanograma por microlitro

d = dias de crescimento

37 = 37° C

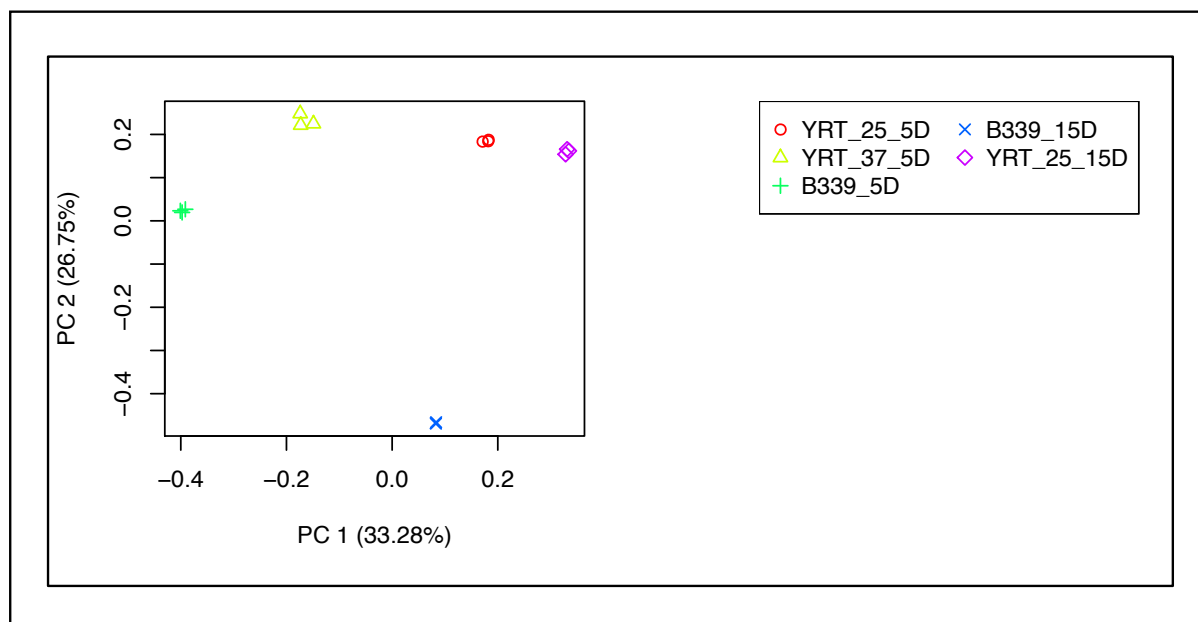
25 = TA

VII. Análise do Componente Principal

A análise do Componente Principal (PCA) foi utilizada para explorar a relação dos valores de FPKM entre as réplicas de cada amostra, identificando *outliers* e outros artefatos biológicos (PCR, lane). Em suma, essa análise agrupa as variáveis (FPKM) em um conjunto de dados pequeno, calcula a variância entre as amostras e suas réplicas biológicas e as apresenta de forma compactada (Figura 27). A análise foi realizada para o primeiro e o segundo PCA, assumindo que primeiro PCA apresenta os resultados de maior variância entre os dados. Observou-se que as réplicas biológicas de cada amostra estão bem relacionadas e homogêneas confirmando a ausência de *outliers* e artefatos. Os eixos do gráfico apresentam a medida de autovalor representando os escores da variância que, entre as amostras, pode ser vista pelos pontos geométricos ocupando regiões distintas do gráfico, principalmente as do micélio (isolado Pb339_M), apresentando maior dissimilaridade (Figura 27).

Figura 27. Análise do componente principal das amostras

Eixos X e Y apresentam escore da variância entre os dados.



VIII. Lista das tabelas gravadas em DVD

A lista a seguir é referente aos arquivos contendo os dados no formato de tabelas completas com as análises computacionais realizadas nesse trabalho.

1. DadoSuplementar_125_YRT-variants.vcf
2. TabSuplementar_curva_crescimento.xlsx
3. DadoSuplementar-PPC_identificacao_molecular_YRT
4. FigSuplementar-bioanalyzer
5. TabSuplementar-Reanotacao-pb18.xlsx
6. TabSuplementar-Raw_data_valores_FPKM_genes_diff_exp_annot_func.xlsx
7. TabSuplementar-Genes_diff_expressos.xlsx
8. blast2go
9. ortólogos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADICONIS, X. et al. Comparative analysis of RNA sequencing methods for degraded or low-input samples. **Nature methods**, v. 10, n. 7, p. 623-629, 2013. ISSN 1548-7091.

ALBUQUERQUE, P. et al. Pbh1 and Pbh2: two mycelium-specific hydrophobin genes from the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol**, v. 41, n. 5, p. 510-20, May 2004. ISSN 1087-1845. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15050540> >.

ALMEIDA, L. M. et al. Cell survival and altered gene expression following photodynamic inactivation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Photochem Photobiol**, v. 88, n. 4, p. 992-1000, 2012 Jul-Aug 2012. ISSN 1751-1097. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22332981> >.

ALTEROVITZ, G.; RAMONI, M. **Knowledge-based bioinformatics: from analysis to interpretation**. John Wiley & Sons, 2011. ISBN 1119995833.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J.Mol.Biol.**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ALVES, F. L. et al. Transposable elements and two other molecular markers as typing tools for the genus *Paracoccidioides*. **Med Mycol**, v. 53, n. 2, p. 165-70, Feb 2015. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25541559> >.

ANDERS, S.; HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biol**, v. 11, n. 10, p. R106, 2010. ISSN 1474-760X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20979621> >.

ANDRADE, R. V. et al. Overview and perspectives the transcriptome of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev Iberoam Micol**, v. 22, n. 4, p. 203-12, Dec 2005. ISSN 1130-1406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16499412> >.

ANDRDE, R. V. et al. Cell organisation, sulphur metabolism and ion transport-related genes are differentially expressed in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium and yeast cells. **BMC**

Genomics, v. 7, p. 208, 2006. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16907987> >.

ANGULO, A. O.; POLLAK, L. Paracoccidioidomycosis. In: (Ed.). **The Pathologic Anatomy of Mycoses**: Springer, 1971. p.507-576. ISBN 3642805728.

ARANDA, P. S.; LAJOIE, D. M.; JORCYK, C. L. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. **Electrophoresis**, v. 33, n. 2, p. 366-9, Jan 2012. ISSN 1522-2683. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22222980> >.

ARANGO, M.; RESTREPO, A. Determination of the growth curves of the mycelial and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v. 59, n. 3, p. 163-9, Oct 1976. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/995172> >.

ARANTES, T. D. et al. Correction: Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 4, p. e0004692, Apr 2016. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27128489> >.

ARAÚJO, F. S. et al. Effects of Argentilactone on the Transcriptional Profile, Cell Wall and Oxidative Stress of *Paracoccidioides* spp. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 1, p. e0004309, Jan 2016. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26734764> >.

ARISTIZABAL, B. H. et al. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. **Infection and immunity**, v. 66, n. 11, p. 5587-5591, 1998. ISSN 0019-9567.

BAILÃO, E. F. et al. *Paracoccidioides* spp. ferrous and ferric iron assimilation pathways. **Front Microbiol**, v. 6, p. 821, 2015. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26441843> >.

BALTAZAR, L. M. et al. Melanin protects *Paracoccidioides brasiliensis* from the effects of antimicrobial photodynamic inhibition and antifungal drugs. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 7, p. 4003-11, Jul 2015. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25896704> >.

BANDEIRA, S. C.; NÓBREGA, M. P. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* COX9, COX12, and COX16 respiratory genes. **Mycol Res**, v. 112, n. Pt 12, p. 1414-20, Dec 2008. ISSN 0953-7562. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18672058> >.

BASTOS, A. S. R. et al. Vaccination with heat shock protein 60 induces a protective immune response against experimental *Paracoccidioides brasiliensis* pulmonary infection. **Infect Immun**, v. 76, n. 9, p. 4214-21, Sep 2008. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18625731> >.

BASTOS, K. P. 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**, v. 7, p. 29, 2007. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17425801> >.

BAUMANN, B. et al. Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. **J Bacteriol**, v. 178, n. 15, p. 4367-74, Aug 1996. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8755862> >.

BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. **Nucleic acids research**, v. 27, n. 2, p. 573, 1999.

BEYHAN, S. et al. A temperature-responsive network links cell shape and virulence traits in a primary fungal pathogen. **PLoS Biol**, v. 11, n. 7, p. e1001614, Jul 2013. ISSN 1545-7885. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23935449> >.

BIALEK, R. et al. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 8, p. 2940-2, Aug 2000. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10921955> >.

BOCCA, A. L. et al. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1177-1191, 2013.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-20, Aug 2014. ISSN 1367-4811. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24695404> >.

BORBA, C. M. et al. Morphological, biochemical and molecular approaches for comparing typical and atypical *Paracoccidioides brasiliensis* strains. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 88, n. 3-4, p. 257-66, 2005 Oct-Nov 2005. ISSN 0003-6072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16284932> >.

BORGES, C. L. et al. Genes Potentially Relevant in the Parasitic Phase of the Fungal Pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, p. 1-9, 2011. ISSN 0301-486X.

BOYCE, K. J.; ANDRIANOPOULOS, A. Fungal dimorphism: the switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 6, p. 797-811, 2015. ISSN 1574-6976.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol Rev**, v. 6, n. 2, p. 89-117, Apr 1993. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8472249> >.

BUU, L. M.; CHEN, Y. C. Impact of glucose levels on expression of hypha-associated secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. **J Biomed Sci**, v. 21, p. 22, 2014. ISSN 1423-0127. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24628998> >.

CALCAGNO, A. M. et al. Geographic discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 6, p. 1733-6, Jun 1998. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9620409> >.

CALICH, V. L. et al. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 223-36, 2008 Apr-May 2008. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18777631> >.

CAMARGO, Z. et al. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **J Clin Microbiol**, v. 26, n. 10, p. 2147-51, Oct 1988. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3141460> >.

CANO, M. I. et al. Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 3, p. 742-7, Mar 1998. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9508305> >.

CARBONELL, L. M. Ultrastructure of dimorphic transformation in *paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol**, v. 100, n. 2, p. 1076-82, Nov 1969. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5359610> >.

CARBONELL, L. M.; RODRIGUEZ, J. TRANSFORMATION OF MYCELIAL AND YEAST FORMS OF *PARACOCCIDIROIDES BRASILIENSIS* IN CULTURES AND IN EXPERIMENTAL INOCULATIONS. **J Bacteriol**, v. 90, p. 504-10, Aug 1965. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14329466> >.

CARRERO, L. L. et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol**, v. 45, n. 5, p. 605-12, May 2008. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18364259> >.

CASTANEDA, E. et al. A culture medium for *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency, and the effect of siderophores. **J Med Vet Mycol**, v. 26, n. 6, p. 351-8, 1988. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2977619> >.

CHUANG, H. Y.; HOFREE, M.; IDEKER, T. A decade of systems biology. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 26, p. 721-44, 2010. ISSN 1530-8995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20604711> >.

CISALPINO, P. S. et al. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Biol Chem**, v. 271, n. 8, p. 4553-60, Feb 1996. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8626811> >.

COCK, P. J. et al. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. **Nucleic Acids Res**, v. 38, n. 6, p. 1767-71, Apr 2010. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20015970> >.

CONESA, A. et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. **Genome Biol**, v. 17, p. 13, Jan 2016. ISSN 1474-760X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26813401> >.

COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saude Publica**, v. 18, n. 5, p. 1441-54, 2002 Sep-Oct 2002. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12244377> >.

CRUZ, R. et al. Conditions for determining the minimal inhibitory concentration (MIC) of seven antifungal agents against *Paracoccidioides brasiliensis* by microdilution: influence of different media, incubation times and temperatures. **Journal of Clinical Microbiology**, 2012. ISSN 0095-1137.

CRUZ, R. C. **Condições experimentais para a determinação da susceptibilidade de *Paracoccidioides brasiliensis* e seleção de subpopulações menos sensíveis a antifúngicos**. 2011. Universidade Federal de Minas Gerais

DA SILVA NETO, B. R. et al. Transcriptional profile of *Paracoccidioides* spp. in response to itraconazole. **BMC Genomics**, v. 15, p. 254, 2014. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24690401> >.

DANTAS, A. S. et al. Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*: assessing catalase and cytochrome c peroxidase. **Mycol Res**, v. 112, n. Pt 6, p. 747-56, Jun 2008. ISSN 0953-7562. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18499421> >.

DESJARDINS, C. A. et al. Comparative Genomic Analysis of Human Fungal Pathogens Causing Paracoccidioidomycosis. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 10, p. e1002345, 2011. ISSN 1553-7404.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res**, v. 8, n. 3, p. 186-94, Mar 1998. ISSN 1088-9051. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9521922> >.

FEITOSA, L. O. S. et al. Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol**, v. 39, n. 1, p. 60-9,

Jun 2003. ISSN 1087-1845. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12742064>>.

FELIPE, M. S. et al. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **J Biol Chem**, v. 280, n. 26, p. 24706-14, Jul 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15849188>>.

FELIPE, M. S. et al. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. **Yeast**, v. 20, n. 3, p. 263-71, Feb 2003. ISSN 0749-503X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12557278>>.

FELIPE, M. S. et al. Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 369-81, Sep 2005. ISSN 0928-8244. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16061364>>.

FERNANDES, L. et al. Cell signaling pathways in *Paracoccidioides brasiliensis*--inferred from comparisons with other fungi. **Genet Mol Res**, v. 4, n. 2, p. 216-31, 2005. ISSN 1676-5680. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16110443>>.

FERREIRA, M. E. et al. Transcriptome analysis and molecular studies on sulfur metabolism in the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mol Genet Genomics**, v. 276, n. 5, p. 450-63, Nov 2006. ISSN 1617-4615. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16924544>>.

FINN, R. D. et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Res**, v. 44, n. D1, p. D279-85, Jan 2016. ISSN 1362-4962. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26673716>>.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 1987. ISSN 0268-1218.

GAUTHIER, G. M. Dimorphism in fungal pathogens of mammals, plants, and insects. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 2, p. e1004608, Feb 2015. ISSN 1553-7374. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25675433>>.

GILMORE, S. A. et al. Genome-wide reprogramming of transcript architecture by Temperature specifies the developmental states of the human pathogen *Histoplasma*. **PLoS Genet**, v. 11, n. 7, p. e1005395, 2015. ISSN 1553-7404.

GIRARDIN, H. A. L., J. P. DNA extraction and quantitation. In: KOBAYASHI, M. E. G. S. (Ed.). **Molecular Biology of Pathogenic fungi. A Laboratory Manual**. New York: Telos Press, 1994. p.5-9.

GOLDMAN, G. H. et al. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 1, p. 34-48, 2003. ISSN 1535-9778.

GREEN, M.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual, vol 1** Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY 2012.

HADDAD, A. et al. Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas. **Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia**, 2007.

HAHN, R. C. et al. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* atypical isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. **Rev Iberoam Micol**, v. 19, n. 1, p. 49-51, Mar 2002. ISSN 2173-9188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12716232> >.

HAHN, R. C. et al. Fatal fungemia due to *Paracoccidioides lutzii*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 91, n. 2, p. 394-398, 2014. ISSN 0002-9637.

HALLAK, J.; SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G. Isolation and wall analysis of dimorphic mutants of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 1, p. 51-62, Mar 1982. ISSN 0036-2174. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7064047> >.

HAMDAN, J. S.; FERRARI, T. C. An atypical isolate of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycoses**, v. 38, n. 11-12, p. 481-4, 1995 Nov-Dec 1995. ISSN 0933-7407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8720200> >.

HERNÁNDEZ, O. et al. A 32-kilodalton hydrolase plays an important role in *Paracoccidioides brasiliensis* adherence to host cells and influences pathogenicity. **Infect Immun**, v. 78, n. 12, p. 5280-6, Dec 2010. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20876288> >.

JORGENSEN, P. et al. High-resolution genetic mapping with ordered arrays of *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants. **Genetics**, v. 162, n. 3, p. 1091-9, Nov 2002. ISSN 0016-6731. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12454058> >.

KASHINO, S. S. et al. Growth curves, morphology and ultrastructure of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **Mycopathologia**, v. 99, n. 2, p. 119-28, Aug 1987. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3657902> >.

KLEIN, B. S.; TEBBETS, B. Dimorphism and virulence in fungi. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 314-9, Aug 2007. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17719267> >.

KURITA, N. et al. An improved culture medium for detecting live yeast phase cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Med Vet Mycol**, v. 31, n. 3, p. 201-5, 1993. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8360811> >.

LACAZ, C. S. **Paracoccidioides brasiliensis: morphology, evolution-ary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy.** CRC Press Boca Raton FL, 1994.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nat Methods**, v. 9, n. 4, p. 357-9, Apr 2012. ISSN 1548-7105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22388286> >.

LI, B.; DEWEY, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. **BMC bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 1, 2011. ISSN 1471-2105.

LI, J. et al. Normalization, testing, and false discovery rate estimation for RNA-sequencing data. **Biostatistics**, v. 13, n. 3, p. 523-38, Jul 2012. ISSN 1468-4357. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22003245> >.

LIMA, P. E. S. et al. Transcriptional and proteomic responses to carbon starvation in *Paracoccidioides*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 5, p. e2855, May 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24811072> >.

LOOSE, D. S. et al. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 24, p. 7659-7663, 1983. ISSN 0027-8424.

MACHIDA, M.; JIGAMI, Y. Glycosylated DNA-binding proteins from filamentous fungus, *Aspergillus oryzae*: modification with N-acetylglucosamine monosaccharide through an O-glycosidic linkage. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 58, n. 2, p. 344-348, 1994. ISSN 0916-8451.

MARESCA, B.; KOBAYASHI, G. S. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi. **Microbiol Rev**, v. 53, n. 2, p. 186-209, Jun 1989. ISSN 0146-0749. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2666842> >.

MARINI, M. M. et al. Identification and characterization of Tc1/mariner-like DNA transposons in genomes of the pathogenic fungi of the *Paracoccidioides* species complex. **BMC Genomics**, v. 11, p. 130, 2010. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20178623> >.

MARIONI, J. C. et al. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. **Genome Res**, v. 18, n. 9, p. 1509-17, Sep 2008. ISSN 1088-9051. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18550803> >.

MARKHAM, P. et al. Choline: its role in the growth of filamentous fungi and the regulation of mycelial morphology. **FEMS Microbiol Rev**, v. 10, n. 3-4, p. 287-300, Apr 1993. ISSN 0168-6445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8318261> >.

MARQUES, E. R. et al. Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. **Mol Genet Genomics**, v. 271, n. 6, p. 667-77, Jul 2004. ISSN 1617-4615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15138890> >.

MARQUES-DA-SILVA, S. H. et al. Occurrence of *Paracoccidioides lutzii* in the Amazon region: description of two cases. **Am J Trop Med Hyg**, v. 87, n. 4, p. 710-4, Oct 2012. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22927496> >.

MARTINS, V. P. et al. Involvement of an alternative oxidase in oxidative stress and mycelium-to-yeast differentiation in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Eukaryot Cell**, v. 10, n. 2, p. 237-48, Feb 2011. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21183691> >.

MARTINS, V. P. et al. Mitochondrial function in the yeast form of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bioenerg Biomembr**, v. 40, n. 4, p. 297-305, Aug 2008. ISSN 0145-479X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18797987> >.

MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol**, v. 23, n. 1, p. 65-73, Jan 2006. ISSN 0737-4038. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16151188> >.

MCEWEN, J. G. et al. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch Med Res**, v. 26, n. 3, p. 305-6, 1995. ISSN 0188-4409. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8580685> >.

MCGOWAN, K. L.; BUCKLEY, H. R. Growth characteristics of the yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis* in a chemically defined medium. **J Gen Microbiol**, v. 130, n. 11, p. 2797-801, Nov 1984. ISSN 0022-1287. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6527125> >.

MEDOFF, G. et al. Irreversible block of the mycelial-to-yeast phase transition of *Histoplasma capsulatum*. **Science**, v. 231, n. 4737, p. 476-9, Jan 1986. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3001938> >.

MENINO, J. F. et al. P. brasiliensis virulence is affected by SconC, the negative regulator of inorganic sulfur assimilation. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74725, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24066151> >.

MORAIS, F. V. et al. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus Paracoccidioides brasiliensis. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 11, p. 3960-6, Nov 2000. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11060052> >.

MUÑOZ, J. F. et al. Genome update of the dimorphic human pathogenic fungi causing paracoccidioidomycosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 12, p. e3348, Dec 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25474325> >.

NAKAI, T. et al. In vitro antifungal activity of Micafungin (FK463) against dimorphic fungi: comparison of yeast-like and mycelial forms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 4, p. 1376-81, Apr 2003. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12654673> >.

NEGRONI, R. Nuevos estudios sobre antígenos para las pruebas serológicas en la blastomicosis sudamericana. **Dermatol Iber Lat Am**, v. 4, p. 409-16, 1968.

NEMECEK, J. C.; WÜTHRICH, M.; KLEIN, B. S. Global control of dimorphism and virulence in fungi. **Science**, v. 312, n. 5773, p. 583-8, Apr 2006. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16645097> >.

NGUYEN, V. Q.; SIL, A. Temperature-induced switch to the pathogenic yeast form of Histoplasma capsulatum requires Ryp1, a conserved transcriptional regulator. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 12, p. 4880-5, Mar 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18339808> >.

NIELSEN, J.; VIDAL, M. Systems biology of microorganisms. **Curr Opin Microbiol**, v. 13, n. 3, p. 335-6, Jun 2010. ISSN 1879-0364. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20434944> >.

NIÑO-VEGA, G. A. et al. RFLP analysis reveals marked geographical isolation between strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, v. 38, n. 6, p. 437-41, Dec 2000. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11204881> >.

NIÑO-VEGA, G. A. et al. Differential expression of chitin synthase genes during temperature-induced dimorphic transitions in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, v. 38, n. 1, p. 31-9, Feb 2000. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10746225> >.

NUNES, L. R. et al. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. **Eukaryotic cell**, v. 4, n. 12, p. 2115-2128, 2005. ISSN 1535-9778.

PAPINI, M.; SALAZAR, M.; NIELSEN, J. Systems biology of industrial microorganisms. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 120, p. 51-99, 2010. ISSN 0724-6145. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20503029> >.

PARENTE, A. F. et al. The response of *Paracoccidioides* spp. to nitrosative stress. **Microbes Infect**, v. 17, n. 8, p. 575-85, Aug 2015. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25841799> >.

PARENTE-ROCHA, J. A. et al. Macrophage Interaction with *Paracoccidioides brasiliensis* Yeast Cells Modulates Fungal Metabolism and Generates a Response to Oxidative Stress. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0137619, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26360774> >.

PARIS, S.; DURAN-GONZALEZ, S.; MARIAT, F. Nutritional studies on *Paracoccidioides brasiliensis*: the role of organic sulfur in dimorphism. **Sabouraudia**, v. 23, n. 2, p. 85-92, 1985. ISSN 0036-2174.

PIGOSSO, L. L. et al. Comparative proteomics in the genus *Paracoccidioides*. **Fungal Genet Biol**, v. 60, p. 87-100, Nov 2013. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23911955> >.

PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-521, 2009. ISSN 0074-0276.

PUCCIA, R.; MCEWEN, J. G.; CISALPINO, P. S. Diversity in *Paracoccidioides brasiliensis*. The PbGP43 gene as a genetic marker. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 275-287, 2008. ISSN 0301-486X.

PUCCIA, R. et al. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infect Immun**, v. 53, n. 1, p. 199-206, Jul 1986. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2424841> >.

PUCCIA, R. et al. The *paracoccidioides* cell wall: past and present layers toward understanding interaction with the host. **Front Microbiol**, v. 2, p. 257, 2011. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22194733> >.

QUEIROZ JÚNIOR, L. E. P. et al. Serological and antigenic profiles of clinical isolates of *Paracoccidioides* spp. from Central Western Brazil. **Mycoses**, v. 57, n. 8, p. 466-72, Aug 2014. ISSN 1439-0507. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24635832> >.

QUEVILLON, E. et al. InterProScan: protein domains identifier. **Nucleic Acids Res**, v. 33, n. Web Server issue, p. W116-20, Jul 2005. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980438> >.

RESTREPO, A.; JIMÉNEZ, B. E. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. **J Clin Microbiol**, v. 12, n. 2, p. 279-81, Aug 1980. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7229010> >.

RESTREPO, A. et al. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 2, p. 346-353, 1984. ISSN 0019-9567.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n.

1, p. 139-40, Jan 2010. ISSN 1367-4811. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19910308> >.

ROBINSON, M. D.; SMYTH, G. K. Moderated statistical tests for assessing differences in tag abundance. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2881-7, Nov 2007. ISSN 1367-4811. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17881408> >.

SALAZAR, M.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infection and immunity**, v. 56, n. 3, p. 711-713, 1988. ISSN 0019-9567.

SALGADO-SALAZAR, C. et al. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. **Cladistics**, v. 26, n. 6, p. 613-624, 2010. ISSN 1096-0031.

SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G. Mutants of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9 affected in dimorphism. **Journal of medical and veterinary mycology**, v. 30, n. 1, p. 51-60, 1992. ISSN 0268-1218.

SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: Virulence and Host Response. **Fungal pathogenesis: principles and clinical applications**, p. 205, 2001. ISSN 0824705688.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol**, v. 40, n. 3, p. 225-42, Jun 2002. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12146752> >.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. **Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism**. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1994.

SANTO, A. H. [Paracoccidioidomycosis-related mortality trend, state of São Paulo, Brazil: a study using multiple causes of death]. **Rev Panam Salud Publica**, v. 23, n. 5, p. 313-24, May 2008. ISSN 1020-4989. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18510791> >.

SANTOS, P. C. et al. The Pivotal Role of 5-Lipoxygenase-Derived LTB 4 in Controlling Pulmonary Paracoccidioidomycosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 8, p. e2390, 2013. ISSN 1935-2735.

SATPATHY, R.; KONKIMALLA, V. B.; RATHA, J. In-silico gene co-expression network analysis in *Paracoccidioides brasiliensis* with reference to haloacid dehalogenase superfamily hydrolase gene. **J Pharm Bioallied Sci**, v. 7, n. 3, p. 212-7, 2015 Jul-Sep 2015. ISSN 0976-4879. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26229356> >.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 27, n. 6, p. 863-4, Mar 2011. ISSN 1367-4811. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21278185> >.

SCHROEDER, A. et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Mol Biol**, v. 7, p. 3, 2006. ISSN 1471-2199. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16448564> >.

SEIFART GOMES, C. et al. Universal stress proteins are important for oxidative and acid stress resistance and growth of *Listeria monocytogenes* EGD-e in vitro and in vivo. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24965, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21980369> >.

SHANKAR, J. et al. Influence of 17 β -estradiol on gene expression of *Paracoccidioides* during mycelia-to-yeast transition. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28402, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22194832> >.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006. ISSN 0037-8682.

SIL, A.; ANDRIANOPOULOS, A. Thermally Dimorphic Human Fungal Pathogens--Polyphyletic Pathogens with a Convergent Pathogenicity Trait. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 5, n. 8, p. a019794, Nov 2014. ISSN 2157-1422. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25384771> >.

SILVA, M. G. et al. The homeostasis of iron, copper, and zinc in *paracoccidioides brasiliensis*, *cryptococcus neoformans* var. *Grubii*, and *cryptococcus gattii*: a comparative analysis. **Front Microbiol**, v. 2, p. 49, 2011. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21833306> >.

SOARES, C. et al. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 2, p. 505-507, 1995. ISSN 0095-1137.

SONG, Y. et al. Role of the RAM network in cell polarity and hyphal morphogenesis in *Candida albicans*. **Mol Biol Cell**, v. 19, n. 12, p. 5456-77, Dec 2008. ISSN 1939-4586. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18843050> >.

SORAIS, F. et al. Cell wall glucan synthases and GTPases in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, v. 48, n. 1, p. 35-47, Feb 2010. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19225978> >.

TAKAYAMA, A. et al. An atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate based on multiple gene analysis. **Med Mycol**, v. 48, n. 1, p. 64-72, Feb 2010. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19225977> >.

TAMAYO, D. et al. Identification and Analysis of the Role of Superoxide Dismutases Isoforms in the Pathogenesis of *Paracoccidioides* spp. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 3, p. e0004481, Mar 2016. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26963091> >.

TAVARES, A. H. et al. Transcriptomic reprogramming of genus *Paracoccidioides* in dimorphism and host niches. **Fungal Genet Biol**, v. 81, p. 98-109, Aug 2015. ISSN 1096-0937. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24560614> >.

TAVARES, A. H. et al. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. **Microbes Infect**, v. 9, n. 5, p. 583-90, Apr 2007. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17387029> >.

TEIXEIRA, M. E. M. et al. Molecular and morphological data support the existence of a sexual cycle in species of the genus *Paracoccidioides*. **Eukaryot Cell**, v. 12, n. 3, p. 380-9,

Mar 2013. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23125354> >.

TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol**, v. 52, n. 2, p. 273-83, Aug 2009. ISSN 1095-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19376249> >.

TEIXEIRA, M. M. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 10, p. e1004397, Oct 2014. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25357210> >.

THEODORO, R. C. et al. Genus *paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37694, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666382> >.

TKACZUK, K. L. et al. Structural and functional insight into the universal stress protein family. **Evol Appl**, v. 6, n. 3, p. 434-49, Apr 2013. ISSN 1752-4571. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23745136> >.

TODD, R. B. et al. Prevalence of transcription factors in ascomycete and basidiomycete fungi. **BMC Genomics**, v. 15, p. 214, 2014. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24650355> >.

TOMAZETT, P. K. et al. 1,3- β -D-Glucan synthase of *Paracoccidioides brasiliensis*: recombinant protein, expression and cytolocalization in the yeast and mycelium phases. **Fungal Biol**, v. 114, n. 10, p. 809-16, Oct 2010. ISSN 1878-6146. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20943190> >.

TORRES, I. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* Pbp27 gene: knockdown procedures and functional characterization. **FEMS Yeast Res**, v. 14, n. 2, p. 270-80, Mar 2014. ISSN 1567-1364. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24118983> >.

TORRES-OLIVA, M. et al. A robust (re-)annotation approach to generate unbiased mapping references for RNA-seq-based analyses of differential expression across closely related species. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 392, 2016. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27220689> >.

VERMITSKY, J. P.; EDLIND, T. D. Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 10, p. 3773-81, Oct 2004. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15388433> >.

VILLAR, L. A.; RESTREPO, A. Virulence of a variant of *Paracoccidioides brasiliensis* that exists in the yeast form at room temperature. **J Med Vet Mycol**, v. 27, n. 3, p. 141-8, 1989. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2778575> >.

VILLAR, L. A.; SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Morphological study of a variant of *Paracoccidioides brasiliensis* that exists in the yeast form at room temperature. **J Med Vet Mycol**, v. 26, n. 5, p. 269-76, 1988. ISSN 0268-1218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3236146> >.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009. ISSN 1471-0056.

WEBSTER, R. H.; SIL, A. Conserved factors Ryp2 and Ryp3 control cell morphology and infectious spore formation in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 38, p. 14573-8, Sep 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18791067> >.

ZAMBUZZI-CARVALHO, P. F. et al. Transcriptional profile of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides lutzii* in response to sulfamethoxazole. **Med Mycol**, v. 53, n. 5, p. 477-92, Jun 2015. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25850856> >.

ZHAO, X.; MEHRABI, R.; XU, J. R. Mitogen-activated protein kinase pathways and fungal pathogenesis. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 10, p. 1701-14, Oct 2007. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17715363> >.