

FERNANDA LOURENÇO ALVES

PAPEL DOS TRANSDUÇÕES DE DNA DA SUPERFAMÍLIA *TC/MARINER*
(TREM A-H) NO RECONHECIMENTO DE LINHAGENS DE FUNGOS
PATOGÊNICOS DO GÊNERO *PARACoccidioides*

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

**Belo Horizonte
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

Fernanda Lourenço Alves

**PAPEL DOS TRANSCRITOS DE DNA DA SUPERFAMÍLIA *TC/MARINER* (TREM A-H)
NO RECONHECIMENTO DE LINHAGENS DE FUNGOS PATOGÊNICOS DO
GÊNERO *PARACDCCIDIUM***

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito para obtenção do
título de mestre em Microbiologia.**

**Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Silva Cisalpino
Co-orientadora: Dra. Marjorie Mendes Marini**

**Belo Horizonte
2012**

Agradecimentos

À Deus, por sua infinita bondade: obrigada pela realização de um sonho.

Aos meus pais que, mesmo sem entender muito minha escolha pela pesquisa, sempre me deram apoio e amor incondicional.

À minha querida vó, pelo seu grande amor e cuidado, e é claro, pelas marmitas gostosas de todo dia!

Ao meu amado noivo André, por todo seu carinho, incentivo, apoio e cumplicidade.

À minha orientadora Patrícia. Mesmo sem me conhecer direito, você me aceitou em seu laboratório e me deu a oportunidade de trabalhar com os transposons, algo que eu sempre achei intrigante e queria estudar desde os tempos da graduação. Eu agradeço de todo o coração a sua orientação, dedicação, sabedoria e cuidado.

À minha co-orientadora Marjorie: obrigada por compartilhar os “seus Trem” comigo! Obrigada por todos os seus ensinamentos, pela paciência e atenção. Sem você não seria possível a realização deste trabalho!

Às professoras Fátima e Viviane, por me acolherem em seu laboratório, o meu muito obrigada!

Ao Marco Aurélio que, desde o começo do mestrado, sempre me ajudou. Obrigada pelos conselhos, incentivo e apoio!

À Lud, minha querida companheira: obrigada pelos almoços compartilhados, conversas e ajuda na preparação de materiais e reagentes.

À Aglaupe e Raquel: muito obrigada pela imensa ajuda na extração de DNA.

Aos demais colegas do LabMic: Vanessa, Fábio, Dalila e Izabela. Obrigada pelas conversas divertidas!

À todos os colegas do LIMHO, em especial à Rosana, Paty Campi, Diogo e Frank, que sempre me ajudaram muito. Obrigada por tudo!

À Gil, nossa técnica de laboratório, obrigada por ser tão prestativa e atenciosa.

Aos amigos Luis e Michelle: espero que nossa caminhada, que começou desde a especialização, continue rumo ao doutorado!

À todos os amigos-irmãos da célula: obrigada pelas orações e pela amizade verdadeira.

Aos colegas de mestrado Gi, Gabi, Rafa e Leandro: obrigada pelo companheirismo.

À todos os professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia, obrigada pela oportunidade e pela excelência do ensino.

À todos os funcionários da secretária da Pós-graduação, obrigada pela disponibilidade e ajuda sempre que precisei.

Às doutoras Rosane Hahn e Mariceli Araújo, e aos doutores Zoilo de Camargo e Marcus Teixeira. Muito obrigada pelos isolados cedidos. A contribuição de vocês enriqueceu muito este trabalho.

À CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

Muito obrigada a todos que sempre torceram por mim e que de alguma forma, contribuíram na realização deste trabalho.

RESUMO

O gênero *Paracoccidioides* é agente da paracoccidioidomicose, micose sistêmica de distribuição restrita à América Latina. O polimorfismo genético entre os isolados de *Paracoccidioides* tem sido extensamente demonstrado por diferentes autores, através de diversas técnicas moleculares. Trabalhos recentes revelaram a existência de duas espécies, *P. lutzii* e *P. brasiliensis*, sendo a primeira originalmente caracterizada como uma espécie filogenética denominada "Pb01-like" e a última constituída de três espécies filogenéticas, denominadas S1, PS2 e PS3. Vários tipos de marcadores moleculares vem sendo propostos para a caracterização de espécies filogenéticas no gênero *Paracoccidioides*. Entretanto, a maioria despence tempo e emprega técnicas bastante laboriosas e/ou caras. Elementos transponíveis tem sido usados no conhecimento da estrutura genética de fungos patogênicos, auxiliando na definição de grupos filogeneticamente relacionados e de importância epidemiológica. Um estudo recente no genoma de *Paracoccidioides* revelou a presença de oito famílias de transposons de DNA, denominadas TremA-H. Os elementos Trem estão distribuídos de forma desigual no genoma de isolados representativos de três espécies filogenéticas de *Paracoccidioides* (*P. lutzii*; PS2 e S1): TremC e H são encontrados em todas as espécies; TremA, B e F, nas espécies filogenéticas PS2 e S1; TremD foi detectado apenas em S1 e TremE somente em *P. lutzii*. Este trabalho relata o emprego de reações de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) para avaliar a utilidade de três marcadores moleculares na discriminação de espécies filogenéticas de *Paracoccidioides*: 1) par de iniciadores destinados à região de indel do gene *hsp70*; 2) marcadores microsatélites de DNA; 3) Trem A-H. Foram estudados 48 isolados de *Paracoccidioides*, sendo trinta previamente classificados segundo a espécie filogenética (10 de *P. lutzii*, 15 de S1, 3 de PS2 e 2 de PS3). 14 isolados puderam ser classificados como *P. lutzii* por meio do uso dos iniciadores dirigidos ao indel do gene *hsp70*, sendo os demais 34 isolados classificados como *P. brasiliensis*. Os marcadores microsatélites utilizados não conseguiram discriminar os isolados entre as três espécies filogenéticas de *P. brasiliensis*. Os resultados obtidos pelo uso da PCR para detecção de elementos TremA-H mostram que TremA, B, F e G são encontrados apenas em *P. brasiliensis* (S1, PS2 e PS3); TremE está presente apenas em *P. lutzii*; TremC e H estão presentes em *P. lutzii* e *P. brasiliensis* (S1, PS2 e PS3). É interessante ressaltar que em *P. brasiliensis*, a amplificação de TremC e TremH mostrou um padrão de duas bandas enquanto que em *P. lutzii*, observou-se apenas uma banda de aproximadamente 2 kb. Em isolados PS3, TremD mostra um padrão de três bandas. Estes resultados confirmam que os padrões de amplificação observados para os oito elementos TremA-H e seu padrão esperado de bandas, podem ser úteis como marcadores moleculares espécie-específicos no gênero *Paracoccidioides*.

ABSTRACT

The genus *Paracoccidioides* is the agent of paracoccidioidomycosis, a systemic mycosis with restricted distribution to Latin America. Genetic polymorphism among isolates of *Paracoccidioides* has been widely demonstrated by different authors using different molecular techniques. Recent studies revealed the existence of two species, *P. lutzii* and *P. brasiliensis*, the first originally characterized as a phylogenetic species called "PB01-like" and the last consists of three phylogenetic species, called S1, PS2 and PS3. Several types of molecular markers have been proposed for the characterization of phylogenetic species in the genus *Paracoccidioides*. However, most spend time and employs techniques quite laborious and/or expensive. Transposable elements have been used to understand the genetic structure of pathogenic fungi, helping to define groups phylogenetically related and of epidemiological importance. A recent study in the genome of *Paracoccidioides* revealed the presence of eight families of DNA transposon, called TremA-H. The distribution of Trem elements varied between the three phylogenetic species of *Paracoccidioides* used (*P. lutzii*, PS2 and S1): TremC and H was found in all species, TremA, B and F in the phylogenetic species S1 and PS2; TremD was only detected in S1 and TremE only in *P. lutzii*. This work reports the use of polymerase chain reaction (PCR) to evaluate the usefulness of three markers to discriminate between the four phylogenetic species of *Paracoccidioides*: a) a primer for the indel region of *hsp70* gene; 2) DNA microsatellite markers; 3) TremA-H. We studied 48 *Paracoccidioides* isolates and thirty was previously classified according to the phylogenetic species (10 *P. lutzii*; 15 S1, 3 PS2 and 2 PS3). 14 isolates could be classified as *P. lutzii* through the use of primers design to indel *hsp70* gene. The other 34 isolates were classified as *P. brasiliensis*. The microsatellite markers used could not discriminate between the three phylogenetic species of *P. brasiliensis*. The results obtained by the use of PCR for TremA-H showed that TremA, B, F and G are only found in *P. brasiliensis* (S1, PS2 and PS3); TremE is present only in *P. lutzii*; TremC and H are present in *P. lutzii* and *P. brasiliensis* (S1, PS2 and PS3). Interestingly, in *P. brasiliensis*, amplification of TremC and TremH showed a pattern of two bands, whereas in *P. lutzii*, was only one band of 2 kb. In PS3 isolates, TremD showed a pattern of three bands. These results confirm the amplification patterns previously observed for the Trem elements and some expected pattern of bands can be useful as molecular markers in the genus *Paracoccidioides*.

LISTA DE SIGLAS

CENPB	<i>Centromere Binding Protein</i>
DDE	<i>DDE catalytic domain</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
FGI	<i>Fungal Genome Initiative Project</i>
g	Grama
°C	Graus Celsius
h	Hora
HTH	<i>Helix-Turn-Helix domain</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
Kb	Quilobases
KDa	Quilodaltons
L	Leveduriforme
l	Litro
LINE	<i>Long Interspersed Nuclear Element</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
M	Micelial
Mb	Megabase
μM	Micromolar
μl	Microlitro
mg	Miligrama
min	Minutos
MITE	<i>Miniature Inverted-repeat Transposable Element</i>
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

nm	Nanômetro
nt	Nucleotídeo
ORF	<i>Open Reading Frame</i> - Janela Aberta de Leitura
pb	Pares de bases
PCM	Paracoccidiodomicose
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
PFGE	<i>Pulsed Field Gel electrophoresis</i> - Eletroforese de campo pulsado
pmol	Pico mol
RAPD	<i>Randon amplification of polymorphic DNA</i> - amplificação randômica de DNA polimórfico
rDNA	DNA ribossomal
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
SINE	<i>Short Interspersed Elements</i>
TSD	<i>Target site duplication</i> - duplicação de sítio alvo
TE	<i>Transposable Element</i> - Elementos transponíveis
TIR	<i>Terminal Inverted Repeat</i> - Repetições terminais invertidas
U	Unidade
UTR	<i>Untranslated region</i> – região não traduzida
UV	Ultravioleta
V	Volts

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição de elementos repetitivos no genoma de <i>Paracoccidioides</i>	35
Tabela 2. Lista de isolados previamente caracterizados segundo a espécie filogenética utilizados neste trabalho.	43
Tabela 3. Lista de isolados não caracterizados segundo a espécie filogenética utilizados neste trabalho.....	45
Tabela 4. Padrões de amplificação para os pares de marcadores microssatélites de DNA que caracterizam as espécies filogenéticas de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	48
Tabela 5. Sequências de iniciadores, tamanho do produto amplificado, e temperatura de anelamento de cada marcador microssatélite.....	50
Tabela 6. Iniciadores destinados as TIR de cada elemento Trem e suas respectivas temperaturas de anelamento.....	51
Tabela 7. Padrões de amplificação obtidos com cinco marcadores microssatélites em 30 isolados cujas espécies filogenéticas eram conhecidas: concordância com os padrões de amplificação previamente descritos para o gênero <i>Paracoccidioides</i>	61
Tabela 8. Padrões de amplificação de cinco marcadores microssatélites observados em isolados cujas espécies filogenéticas não haviam sido previamente caracterizadas.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica da paracoccidiodomicose na América Latina.....	19
Figura 2. Espécies crípticas de <i>P. brasiliensis</i>	24
Figura 3. Relação entre isolados representativos das 3 espécies filogenéticas (S1, PS2, PS3) e de 17 isolados caracterizados como <i>Pb01-like</i>	25
Figura 4. Estrutura e organização dos transposons de DNA de <i>Paracoccidoides</i>	36
Figura 5. Sequência consenso da região conservada do elemento TremG.....	53
Figura 6. Resolução eletroforética dos produtos obtidos pela amplificação por PCR empregando o par de iniciadores HSPMMT1 e PLMMT destinados à região de indel do gene <i>hsp70</i>	55
Figura 7. Resolução eletroforética dos produtos da amplificação por PCR dirigida à região de indel do gene <i>hsp70</i> a partir do DNA genômico de isolados não caracterizados previamente quanto à espécie filogenética.....	56
Figura 8. Resolução eletroforética dos produtos da amplificação dos cinco marcadores microssatélites de DNA em trinta isolados de <i>Paracoccidoides</i> previamente caracterizados segundo a espécie filogenética.....	60
Figura 9. Resultado da amplificação dos cinco marcadores microssatélites de DNA nos dezoito isolados de <i>Paracoccidoides</i> não caracterizados segundo a espécie filogenética.....	62

Figura 10. Resolução eletroforética dos produtos da amplificação por PCR de sete elementos Trem em doze isolados de *Paracoccidioides* previamente caracterizados quanto à espécie filogenética..... 66

Figura 11. Resolução eletroforética dos produtos da amplificação por PCR de sete elementos Trem em dezoito isolados de *Paracoccidioides* não caracterizados quanto à espécie filogenética..... 68

Figura 12. Resolução eletroforética dos produtos da amplificação do elemento TremG em quarenta e oito isolados de *Paracoccidioides*..... 69

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1.Revisão de literatura.....	15
1.1.1. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e a Paracoccidioidomicose.....	15
1.1.2.Caracterização genética de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	20
1.1.3.Espécies filogenéticas do gênero <i>Paracoccidioides</i>	23
1.1.4.Elementos transponíveis.....	28
1.1.5.Transposons de DNA – mecanismos do tipo “cortar e colar”.....	30
1.1.6.Elementos transponíveis em fungos	32
1.2.Justificativa.....	38
2.OBJETIVOS	40
2.1.Objetivo geral.....	40
2.2.Objetivos Específicos.....	40
3.METODOLOGIA	41
3.1.Microrganismos.....	41
3.2.Manutenção dos isolados.....	41
3.3.Extração de DNA genômico do fungo.....	41
3.4.Caracterização dos isolados de <i>Paracoccidioides</i> segundo a espécie filogenética por meio de <i>Polimerase Chain Reaction</i>	46

3.4.1. Indel do gene <i>hsp70</i>	46
3.4.2. Microssatélites de DNA.....	47
3.4.3. Elementos transponíveis.....	50
3.4.3.1. Trem A,B,C,D,E,F e H.....	50
3.4.3.2. TremG.....	52
4.RESULTADOS	54
4.1. Caracterização de espécies do gênero <i>Paracoccidioides</i> : amplificação por PCR de uma região correspondente ao indel do gene.....	54
4.1.1. Amplificação em isolados cuja espécie filogenética foi previamente caracterizado.....	54
4.1.2. Amplificação em isolados cuja espécie filogenética não era conhecida.....	56
4.2. Microssatélites de DNA.....	57
4.2.1. Amplificação dos cinco marcadores microssatélites nos isolados previamente caracterizados segundo a espécie filogenética.....	58
4.2.2. Amplificação dos cinco marcadores microssatélites nos isolados não caracterizados previamente segundo a espécie filogenética.....	59
4.3. Amplificação de transposons Trem A-H.....	64
4.3.1. Presença dos transposons Trem A,B,C,D,E,F e H em isolados previamente caracterizados quanto à espécie filogenética.....	64
4.3.2. Amplificação dos transposons TremA,B,C,D,E,F e H em isolados não caracterizados previamente segundo à espécie filogenética.....	65
4.4. Trem G.....	67
5.DISSCUSSÃO	70

6.CONCLUSÕES.....	86
7.REFERÊNCIAS.....	87

1.INTRODUÇÃO

1.1.REVISÃO DE LITERATURA

1.1.*Paracoccidioides brasiliensis* e a Paracoccidioidomicose

Paracoccidioides brasiliensis é a fase anamórfica (mitospórica ou assexuada) de um ascomiceto pertencente à Ordem Onygenales, Família Ajellomycetaceae, a qual inclui também os gêneros anamorfos *Blastomyces*, *Histoplasma* e *Emmonsia* (UTEREINER *et al.*, 2004). As espécies que compõem a família Ajellomycetaceae estão associadas à vertebrados, compartilham substratos semelhantes, tais como fezes e solo, e possuem características fisiológicas comuns como a capacidade de crescimento a 36°C (THEODORO *et al.*, 2011).

O fungo, isolado pela primeira vez em 1908, por Adolfo Lutz, é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica caracterizada pelo desenvolvimento de lesões granulomatosas com frequente evolução crônica. *P. brasiliensis* apresenta dimorfismo térmico reversível: quando cultivado a temperatura de 35 a 37°C apresenta-se sob a forma de levedura (parasitária), e à temperatura de 25 a 28°C, apresenta-se na forma de micélio (forma infectante, sapróbia).

O habitat natural e a eco-epidemiologia de *P. brasiliensis* ainda não foram bem esclarecidos. Acredita-se que o habitat do fungo seja o solo, entretanto existem poucos isolados desta fonte (NEGRONI, 1966; RESTREPO, 1985; MONTENEGRO *et al.*, 1996; SILVA-VERGARA *et al.*, 1998). Além do solo, o fungo foi também isolado de ração de cachorro, tecidos de tatus (*Dasybus novemcintus* e *Cabassous centralis*) e de fezes de pingüim (GROOSSE, 1965; GEZUELE, 1989; FERREIRA *et al.*, 1990; BAGAGLI *et al.*, 1998). O caráter casual e não repetitivo de muitas destas observações, aliado às dificuldades de isolamento ambiental, dificultam a exata localização deste patógeno no ambiente. Além disso, a falta de surtos epidêmicos, o

prolongado período de latência da doença e frequentes migrações das populações de áreas endêmicas, dificultam a identificação dos locais onde a infecção foi adquirida (RESTREPO, 1985).

É interessante destacar que com o advento das técnicas moleculares capazes de detecção específica de DNA em diferentes ambientes, observou-se em trabalho recente aplicação da técnica de *Nested-PCR* para a identificação da presença do fungo em carcaças de mamíferos selvagens como porco-da-índia (*Cavia aperea*), porco-espinho (*Sphiggurus spinosus*), guaxinim (*Procyon cancrivorus*), furão (*Gallictis vittata*) e em tamanduás (*Myrmecophaga tridactyla*) (RICHINI-PEREIRA *et al.*, 2008; 2009). Recentemente, anticorpos contra gp43 de *P. brasiliensis* foram detectados através da técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) em cães rurais e urbanos da cidade de Uberaba, Minas Gerais, (FONTANA *et al.*, 2010), em frangos provenientes do Mato Grosso do Sul e Paraná (OLIVEIRA *et al.*, 2010) e em ovelhas de Guarapuava, Paraná (OLIVEIRA *et al.*, 2011), reforçando a ideia de que o contato com o solo em áreas endêmicas é um importante fator de risco para a infecção pelo fungo. O primeiro caso de PCM em gatos (GONZALEZ *et al.*, 2010) e num bicho-preguiça (*Choloepus didactylus*) (TREJO-CHÁVEZ, *et al.*, 2011) foram relatados, respectivamente, no Chile e no México.

Além da espécie humana, apenas tatus e cães foram apontados como hospedeiros afetados pelo *P. brasiliensis* (BAGAGLI *et al.*, 1998; SILVA-VERGARA *et al.*, 2000; BAGAGLI *et al.*, 2003; RICCI *et al.*, 2004; FONTANA *et al.*, 2010). Evidências epidemiológicas e experimentais sugerem que a infecção natural ocorra por inalação de conídios produzidos pela forma miceliana do fungo. Ao atingirem o pulmão, os conídios são fagocitados por macrófagos alveolares e iniciam sua transformação em células leveduriformes. Desse modo, as lesões primárias ocorrem com maior frequência nos pulmões, dando origem a uma infecção subclínica que pode evoluir para a cura, tornar-se latente ou ainda disseminar-se para outros órgãos, por via hematogênica ou linfática, causando doença (BRUMMER *et al.*, 1993; FRANCO *et al.*, 2000).

A PCM é uma doença sistêmica de caráter granulomatoso, uma vez que a principal defesa do hospedeiro contra o fungo é a resposta imune mediada por células. A micose apresenta duas formas clínicas: a forma aguda, que afeta principalmente crianças e jovens, progredindo rapidamente e disseminando-se pelo sistema linfático, podendo levar ao óbito se não tratada. Já a forma crônica que corresponde a 90% dos casos, desenvolve-se gradualmente nos pulmões, podendo apresentar lesões disseminadas, dependendo da integridade imunológica do indivíduo infectado (FRANCO *et al.*, 1987). Esta forma clínica geralmente afeta trabalhadores rurais, em sua maioria homens, onde a PCM é mais frequente. A maior incidência da doença no sexo masculino pode estar ligada a fatores hormonais femininos que confeririam proteção, uma vez que, *in vitro*, o 17- β -estradiol bloqueia a transformação do micélio em levedura (RESTREPO *et al.*, 1984; ARISTIZABAL *et al.*, 1998; RESTREPO *et al.*, 2008).

A patogenicidade parece estar intimamente ligada à transição dimórfica em *P. brasiliensis*, uma vez que linhagens incapazes de se transformarem em leveduras não são virulentas (TOLEDO *et al.*, 1999; GOLDMAN *et al.*, 2003). As mudanças morfológicas no fungo são acompanhadas de reorganização celular dos lipídeos da membrana, na composição da parede celular, com aumento na quantidade de quitina e mudança do polímero predominante, que passa de β -1,3-glucana (no micélio) para α -1,3-glucana (na levedura) (SAN-BLAS & NIÑO-VEGA, 2001). Abordagens baseadas em análises do transcriptoma das formas miceliana e leveduriforme de *P. brasiliensis*, indicaram que as alterações celulares são complexas e extensas, envolvendo a expressão diferencial de numerosos genes pertencentes a várias categorias funcionais, como de resposta ao estresse, virulência e de estrutura celular, e de vias metabólicas distintas, como metabolismo de carboidratos e enxofre (FELIPE *et al.*, 2003; GOLDMAN *et al.*, 2003; FELIPE *et al.*, 2005).

Dados epidemiológicos indicam uma ampla distribuição geográfica da doença na América Central e Sul, estendendo-se da Argentina ao México, ocorrendo principalmente na Colômbia, Venezuela e Brasil (RESTREPO, 1985; BRUMMER *et al.*, 1993) (FIGURA 1). O Brasil responde por 80% dos casos relatados e a micose

ocupa a décima posição entre as maiores endemias brasileiras. Prado e colaboradores (2009) avaliaram as taxas de mortalidade atribuídas às micoses sistêmicas mais importantes no Brasil no período de 1996 a 2006. A PCM foi a principal causa de morte entre as micoses sistêmicas (51,2%), seguida por criptococose, candidíase e histoplasmose. Os maiores índices de mortalidade foram encontrados na região Sudeste, principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, e na região Sul, nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul.

O diagnóstico microbiológico da PCM é baseado na evidência do agente etiológico sob a forma de leveduras características de *P. brasiliensis* em amostras biológicas como raspados de lesão e secreções como escarro, lavado broncoalveolar, pus e biópsia de tecidos mucocutâneos, por meio de exame direto e/ou pelo seu isolamento em cultura. Técnicas sorológicas também podem ser utilizadas para detecção de anticorpos anti-*P. brasiliensis*, tais como imunodifusão em ágar e ELISA. Para diagnóstico molecular, as regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA e o gene *gp43* têm sido utilizadas para o desenho de iniciadores para identificação de *P. brasiliensis* em cultura ou em amostras clínicas (SAN-BLAS & NIÑO-VEGA, 2008).

O tratamento da doença é geralmente prolongado, com pacientes recebendo terapia por um período entre um a dois anos. Na ausência de tratamento, a doença é usualmente fatal. Vários antifúngicos podem ser utilizados para o tratamento, tais como sulfamídicos (associação sulfametoxazol/trimetropim), azólicos (cetoconazol e itraconazol) e anfotericina B (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

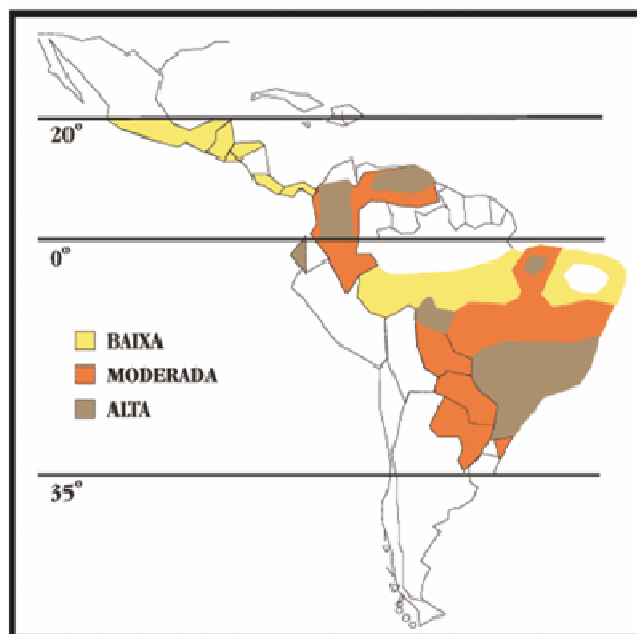


Figura 1. Distribuição geográfica da paracoccidiodomicose na América Latina. A incidência da doença é maior no Brasil, principalmente nas regiões sudeste, centro-oeste e sul, onde a taxa de distribuição da PCM é considerada de moderada a alta. **Fonte: SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006.**

1.1.2. Caracterização genética de *Paracoccidioides brasiliensis*

O conhecimento acerca da composição genética em *P. brasiliensis* é recente. Um estágio teleomórfico, sexuado, ainda não foi descrito, o que impossibilita as análises genéticas clássicas que, com base em cruzamentos, permitiriam estudar a segregação de marcadores e recombinação na progênie resultante. Como muitos outros fungos, o *P. brasiliensis* é refratário à análise citogenética já que por seu pequeno tamanho e ausência de condensação da cromatina os cromossomos não podem ser visualizados à microscopia ótica (BOEKHOUT *et al.*, 1993).

O emprego de técnicas moleculares tem sido determinante na categorização taxonômica e genética de *P. brasiliensis*. Ressalta-se o trabalho de Utereiner e colaboradores (2004) que, com base em análises de sequências nucleares de LSU (*Large Subunit*) e ITS rDNA, reconheceram um novo clado de Onygenales que compreende os gêneros *Ajellomyces* (incluindo os anamorfos *Blastomyces*, *Emmonsia*, *Histoplasma*) e *Paracoccidioides*.

A técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA Analysis*) foi amplamente utilizada para determinar a variabilidade genética em isolados de *P. brasiliensis* indicando a existência de uma possível correlação entre distribuição geográfica e com características clínico-epidemiológicas (SOARES *et al.*, 1995; CALCAGNO *et al.*, 1998; MOLINARI-MADLUN *et al.*, 1999; HAHN *et al.*, 2003; KUROKAWA *et al.*, 2005).

Destacam-se também os trabalhos de Montoya e colaboradores (1997) e de Cano e colaboradores (1998) que padronizaram as condições para a separação eletroforética dos cromossomos de *P. brasiliensis* pela técnica de PFGE (*Pulsed-field gel electrophoresis*). Os resultados evidenciaram um número haplóide de 4 a 5 bandas cromossômicas na faixa de 2,0 a 10,0 Mb, e o tamanho do genoma foi estimado em aproximadamente 30 Mb. Esses estudos indicaram, preliminarmente, a existência de variações nos padrões eletroforéticos de migração dos cromossomos de *P. brasiliensis*, revelando polimorfismos de tamanho e número de bandas cromossômicas.

Com o objetivo de determinar a identidade cromossômica, Feitosa e colaboradores (2003) utilizaram a técnica de PFGE e mapeamento cromossômico para estabelecer e comparar o cariótipo de 12 isolados clínicos e ambientais de *P. brasiliensis* de diferentes regiões geográficas. Foram observados perfis com 4 ou 5 bandas cromossômicas cujos tamanhos variaram entre 2,5 e 9,5 Mb. Os resultados também indicaram a existência de variações genéticas intraespecíficas em isolados ambientais e, apesar do polimorfismo cromossômico observado, acredita-se que a estrutura geral do genoma de *P. brasiliensis* seja bem conservada.

Uma alta heterogeneidade genética foi demonstrada quando a RAPD associada à PFGE foram utilizadas por Guerra (2006) para a análise dos padrões de 24 isolados clínicos e ambientais do fungo. Análises por RAPD decorrentes da utilização de seis iniciadores selecionados e previamente utilizados por outros autores (Soares *et al.*, 1995; Calcagno *et al.*, 1998; Molinari-Madlum *et al.*, 1999 e Motta *et al.*, 2002) cujos resultados indicavam a existência de dois grandes grupos bem definidos e com um baixo coeficiente de similaridade genética entre eles. Na maioria dos dendogramas individuais construídos a partir de cada par de iniciadores, os isolados denominados Pb01, ED01, 1578, 113, 63265, constituíram um primeiro grupo, sendo o segundo grupo formado pelos demais isolados. Através da técnica de PFGE foram observados 9 perfis cromossômicos diferentes, com polimorfismo de número de bandas (4 ou 5) e de tamanho, que variou de 2,7 a 9,5 Mb (GUERRA, 2006).

Em diversos trabalhos, os resultados obtidos por PFGE indicam que a cariotipagem por si só não poderia ser um método determinante para identificação de espécies filogenéticas, uma vez que isolados filogeneticamente relacionados possuem perfis cromossômicos diferentes. O tamanho do genoma haplóide, calculado com base na somatória dos pesos moleculares dos cromossomos resolvidos por PFGE foi de 20,9 a 28,8 Mb, semelhante a outros estudos que previamente o estimaram em 23 a 31 Mb (MONTROYA *et al.*, 1997; CANO *et al.*, 1998; MONTROYA *et al.*, 1999; FEITOSA *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2007).

Recentemente, o *Broad Institute* disponibilizou a sequência genômica de três isolados representativos de três espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* (Pb18-

S1; Pb03-PS2; Pb01-Pb01-like) como parte do *Fungal Genome Initiative (FGI) Project*. O tamanho do genoma do isolado Pb03 (PS2) foi estimado em 29,06 Mb, com conteúdo de CG de 44,5% e 7875 genes preditos. O genoma de Pb18 (S1) foi estimado em 29,95 Mb com conteúdo de CG de 44,36% e 8741 genes preditos e o de Pb01 (*Pb01-like*), que apresentou algumas características diferentes dos demais, apresentou um genoma de tamanho maior, 32,94 Mb, assim como maior número de genes preditos, 9132; já o conteúdo de CG foi menor 42,82%. Os três genomas apresentam uma alta sintenia, e Pb18 e Pb03 compartilham alta similaridade (em torno de 96%) em comparação com Pb01 (90%) (DESJARDINS, *et al.*, 2011).

Além disso, o sequenciamento genômico proporcionou novas evidências favoráveis à existência de um estágio sexual em *P. brasiliensis*. Foram encontrados genes envolvidos na recombinação e coesão cromossômica que são conservados em eucariotos sexuados, além de genes necessários para o *mating* e meiose.

A identificação de novos alvos de drogas também foi possível a partir do conhecimento do genoma do fungo. Genes envolvidos em biossíntese de esteróis, como o gene que codifica para a SMT (24-C-metiltransferase), altamente conservado nos três genomas de *Paracoccidioides*, tem sido investigados como alvo de análogos do azasterol, potente inibidor da enzima SMT. Foram, ainda, identificados um total de 1.977 proteínas altamente conservadas no fungo e que não são encontradas no genoma humano (DESJARDINS *et al.*, 2011). Abadio e colaboradores (2011) identificaram no genoma de *Paracoccidioides* e de outros seis fungos patogênicos (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum*) dez genes ortólogos de possíveis alvos de drogas que estão ausentes no homem. Entre estes genes, quatro se mostraram bons candidatos: *trr1*, *rim8*, *kre2* e *erg6*. Todos os quatro genes foram identificados como alvos potenciais também no transcriptoma de *P. lutzii*, isolado Pb01 (descrito por Felipe e colaboradores, 2005). Apenas *trr1* e *rim8* são genes essenciais, sendo responsáveis, respectivamente, pela homeostase e resposta ao pH alcalino. Os genes *kre2* e *erg6* estão envolvidos na viabilidade celular e sobrevivência no hospedeiro (Abadio *et al.*, 2011).

1.1.3. Espécies filogenéticas do gênero *Paracoccidioides*

Métodos de análise filogenética que utilizam sequências de DNA como caracteres vêm sendo extensivamente empregados para análises populacionais, incluindo descrição de novas espécies. Usando estas ferramentas, trabalhos recentes demonstraram que a variabilidade genética de *P. brasiliensis* pode ir além de um simples polimorfismo intraespecífico, caracterizando a presença de espécies crípticas, ou seja, espécies em divergência evolutiva, cujos caracteres fenotípicos até então conhecidos não seriam suficientes para distingui-las (FUTUYAMA, 2002).

Matute e colaboradores (2006a) analisaram sequências de DNA de oito regiões de cinco genes nucleares codificadores com o objetivo de caracterizar a variação genética e o modo de reprodução de *P. brasiliensis*. Foram utilizados 65 isolados do fungo, representativos de seis áreas endêmicas de PCM. Através da análise por concordância genealógica dos cinco genes, foi possível detectar três espécies crípticas: S1 (38 isolados), encontrada no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela; PS2 (6 isolados), encontrada no Brasil e Venezuela e PS3 (21 isolados), encontrada apenas na Colômbia (FIGURA 2). Dados obtidos no trabalho demonstram que S1 e PS2 são simpátricas e, portanto, a divergência genética entre as duas sugere a existência de uma barreira não geográfica ao fluxo gênico. Considerando que PS3 é restrito geograficamente à Colômbia, o processo de especiação pode ser atribuído à dispersão ou outro evento que levou o isolamento genético de PS3 a partir de S1 (Matute *et al.*, 2006a). Esse estudo forneceu, ainda, evidências para a possível ocorrência de reprodução sexual em *P. brasiliensis*, na espécie filogenética S1, mas não apontou isto nas outras duas espécies propostas.

Destaca-se, também, na literatura, o trabalho de Carrero e colaboradores (2008) que investigaram, por concordância genealógica, regiões codificadoras e não codificadoras de vários genes e sequências ITS de 21 isolados de *P. brasiliensis*. Destes, 14 foram utilizados por Matute e colaboradores (2006a) e sete ainda não haviam sido analisados anteriormente. Os autores observaram que a maior parte dos isolados agrupou conforme as três espécies filogenéticas propostas, porém, um isolado clínico, denominado Pb01, posicionou-se distante dos três clados, a tal

ponto que os autores sugeriram que este poderia ser um representante de uma nova espécie do gênero *Paracoccidioides*.

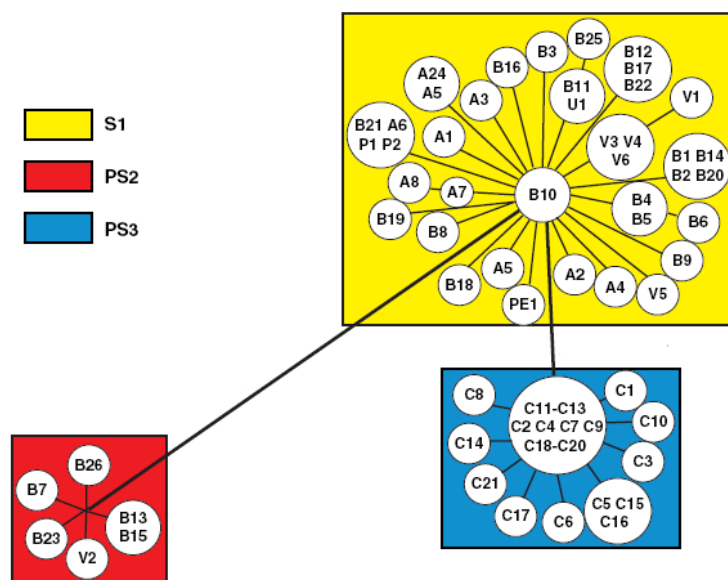


Figura 2. Espécies crípticas de *P. brasiliensis*. As árvores mostram os diversos isolados utilizados por Matute e colaboradores (2006) e sua divisão em espécies crípticas S1 (38 isolados), PS2 (6 isolados), PS3 (21 isolados). A classificação dos 65 isolados nos três cladogramas (S1/PS2/PS3) foi feita através da análise de concordância genealógica de oito regiões pertencentes a cinco genes nucleares. **Fonte: Matute et al., 2006.**

O método de concordância genealógica para o reconhecimento de espécies filogenéticas (GCPSR – *Genealogic Concordance for Phylogenetic Species Recognition*) foi utilizado por Teixeira e colaboradores (2009) com o objetivo de determinar a existência de novas espécies no gênero *Paracoccidioides*. O gene *hsp70* foi utilizado como marcador molecular para identificação de isolados geneticamente semelhantes ao isolado Pb01 (*Pb01-like*) entre 49 isolados do fungo de diferentes regiões geográficas. Foram identificados dezessete isolados *Pb01-like*, que compartilham um “indel” no primeiro íntron do gene *hsp70*. Além disso, foram utilizados 13 *loci* gênicos previamente descritos na literatura (MATUTE et al., 2006a; CARRERO et al., 2008) para estabelecimento de relações filogenéticas entre 88 isolados representativos dos grupos *Pb01-like*, PS2, PS3 e S1. Os resultados

demonstram a existência de dois clados, com um ancestral comum de 32 milhões de anos. O primeiro clado é formado pelas espécies filogenéticas S1/PS2/PS3 e o segundo compreende somente os isolados *Pb01-like* (FIGURA 3). Com base nos dados gerados, os autores propõem a existência de uma nova espécie, denominada de *Paracoccidioides lutzii*, em homenagem a Adolfo Lutz.

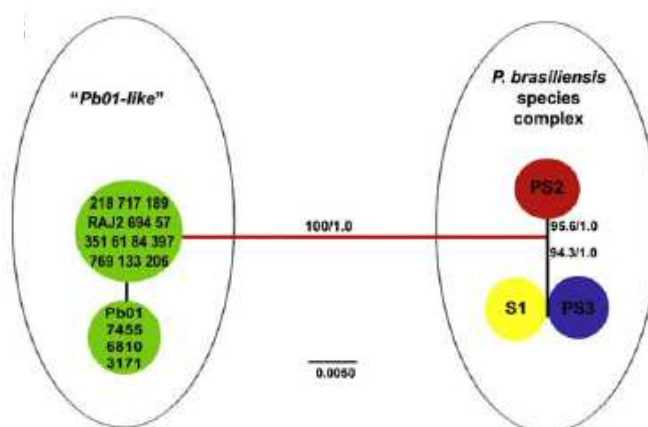


Figura 3. Relação entre isolados representativos das 3 espécies filogenéticas (S1, PS2, PS3) e de 17 isolados caracterizados como *Pb01-like*. De acordo com o autor, as árvores consenso demonstram a distância que separa as 3 espécies filogenéticas do grupo *Pb01-like*. Os ramos filogenéticos mostram os valores de *bootstrap* e valores de probabilidade posteriores, respectivamente. **Fonte: TEIXEIRA et al., 2009.**

Desta forma, a partir do trabalho de Teixeira e colaboradores (2009) admite-se que o gênero *Paracoccidioides* seja composto por duas espécies - *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Assim, a partir deste momento, a nomenclatura referente à nova espécie, *P. lutzii*, será adotada neste trabalho.

O conceito de espécie filogenética, a qual pode ser detectada através da divergência genética a partir de sequências de múltiplos loci gênicos, parece ser o mais apropriado para o reconhecimento de espécies fúngicas (THEODORO et al., 2008). O uso de sequências de DNA para estudos filogenéticos é altamente informativo, principalmente no caso de microrganismos como fungos, para os quais existem poucos caracteres morfológicos devido à sua simplicidade e baixa

diferenciação celular. Entretanto, a aquisição de sequências de DNA de vários *loci* com variação genética suficiente para detectar espécies filogenéticas pode ser extremamente laboriosa, tornando o uso de marcadores moleculares mais atrativo para o reconhecimento de isolados pertencentes às diferentes espécies crípticas (TAYLOR *et al.*, 2000).

Vários marcadores moleculares têm sido descritos para fungos do gênero *Paracoccidioides*. Um dos primeiros tipos de marcadores moleculares a serem utilizados foram os microssatélites de DNA. Microssatélites são sequências altamente polimórficas, dispostas em *tandem*, geralmente compostas por um a seis pares de bases. Nascimento e colaboradores (2004) observaram 1117 padrões de microssatélites em 0,47% do DNA de *P. brasiliensis* analisado de uma coleção de RST (*Random Sequence Tags*). A partir de resultados obtidos *in silico*, foram desenhados dois pares de iniciadores de microssatélites com o objetivo de buscar correlacionar o isolado (clínico ou ambiental) com a forma clínica da PCM (aguda ou crônica) por ele determinada no paciente. Não foram observadas correlações entre a forma clínica da PCM e o padrão resultante da amplificação empregando os marcadores microssatélites (NASCIMENTO *et al.*, 2004).

Matute e colaboradores (2006b), com o objetivo de identificar a espécie filogenética de isolados de *P. brasiliensis*, descreveram um sistema baseado em PCR e sequenciamento de cinco marcadores microssatélites. Apesar de não ter sido possível o uso individual de nenhum dos microssatélites para distinção entre as espécies, os autores afirmam que o sistema mostrou-se útil na discriminação entre isolados da espécie filogenética S1 e PS2 (MATUTE *et al.*, 2006b). Além dos microssatélites, vários genes codificadores de proteínas tem sido utilizados para identificar a espécie filogenética de isolados de *Paracoccidioides*.

O gene *PbGP43*, um dos mais polimórficos (MATUTE *et al.*, 2006a; TEIXEIRA *et al.*, 2009), foi utilizado no trabalho de Morais e colaboradores (2000). A partir da análise da distribuição de vinte e um sítios de substituição de aminoácidos de Gp43 em dezessete isolados de *P. brasiliensis*, foram definidos seis genótipos diferentes denominados de A-F. Os isolados S1 se encontram nos genótipos B, D, E e os PS3 possuem o genótipo C. O genótipo A, encontrado apenas em isolados

PS2, foi o mais polimórfico com 15 sítios de substituição. Para estes isolados do genótipo A, foi observada uma baixa virulência quando inoculados em camundongos por diferentes vias (CARVALHO *et al.*, 2005).

Theodoro e colaboradores (2008) avaliaram a inteína PRP8 de *Paracoccidioides* como marcador molecular para caracterização de isolados do fungo de acordo com as três espécies filogenéticas propostas por Matute e colaboradores (2006a). Foram utilizados 22 isolados, sendo treze S1, cinco PS2, dois PS3 e dois isolados de espécie filogenética até então desconhecida (PbCão e Pb01). Os resultados das análises filogenéticas separam claramente os isolados nas três espécies filogenéticas e, além disso, foi possível classificar o isolado PbCão em PS2 e demonstrar que o isolado Pb01 não pertencia a nenhum dos três clados propostos.

Salgado-Salazar e colaboradores (2010) sequenciaram e analisaram por concordância genealógica cinco genes mitocondriais (*COB*, *COX3*, *RNS*, *RNL* e *ATP6*) de isolados de *P. brasiliensis* pertencentes às espécies filogenéticas S1, PS2, PS3 e de *P. lutzii*. Por meio de inferências filogenéticas realizadas por máxima parcimônia e análise Bayesiana, os autores consideram que o gênero *Paracoccidioides* seja composto apenas por duas espécies: *P. lutzii* e *P. brasiliensis*, cujos grupos genéticos reprodutivamente isolados (S1, PS2, PS3) representam na verdade variantes geográficos e não espécies distintas.

1.1.4. Elementos transponíveis

Elementos transponíveis (*Transposable elements* – TE) são sequências de DNA que possuem a capacidade intrínseca de se mover ao longo do genoma da célula. Foram descobertos nos anos 40 por Bárbara McClintock, que recebeu o prêmio Nobel em 1983 por seu estudo do padrão de cores no milho.

Os TE estão presentes no genoma das espécies que compõem os três domínios da vida: Eubactérias, Arqueobactérias e Eucariotos. Estes elementos possuem grande influência na evolução dos genomas, particularmente através do controle de genes (BIÉMONT & VIEIRA, 2006).

Wicker e colaboradores (2007) sugeriram um sistema de classificação desses elementos que apresenta vários níveis hierárquicos, sendo primeiramente divididos em duas classes: elementos de classe I, retrotransposons, que transpõem por um intermediário de RNA que sofre transcrição reversa; e os elementos de classe II, transposons de DNA, que transpõem por meio de um intermediário de DNA. Em seguida, os elementos são divididos em subclasses, ordem, superfamília, família e subfamília.

Os retrotransposons (classe I) codificam várias enzimas como a integrase e a transcriptase reversa. Podem ser divididos em 5 ordens com base nas características de seus mecanismos de transposição, organização e filogenia de sua transcriptase reversa: LTRs, LINEs, SINEs, elementos *Penelope*-like (PLEs) e elementos *DIRS*-like (WICKER *et al.*, 2007). Os transposons de DNA (classe II) utilizam uma fita simples ou dupla de DNA como intermediário e são divididos em duas subclasses de acordo com o número de fitas de DNA que são cortadas durante a transposição.

Os transposons de DNA da subclasse 1 são formados por uma região codificadora que permite a transcrição de uma enzima, a transposase. A região codificadora é flanqueada por pequenas terminações invertidas repetidas (TIR – *Terminal Inverted Repeats*). A transposase é responsável pelo reconhecimento e ligação às TIR, o que promove a remoção do transposon e sua reinserção no novo sítio alvo. Outra peculiaridade dos transposons de DNA é que sua integração leva a

uma pequena duplicação do DNA no sítio alvo. Por isto, todos os transposons de DNA da subclasse 1 são flanqueados por uma duplicação deste sítio (TSD – *Target Site Duplication*), que é característica de cada elemento.

Foram descritas dez superfamílias de transposons de DNA da subclasse 1, diferenciadas com base na sequência das TIR e no tamanho e sequências das TSD, sendo elas: *Tc1/mariner*, *hAT*, *Mutator*, *Merlin*, *Transib*, *P*, *PiggyBac*, *PIF-Harbinger*, *Banshee* e *CACTA*. Dentre estas, a superfamília *Tc1/mariner* é a maior e compreende a maioria dos transposons já descritos (DABOUSSI & CAPY, 2003; WICKER *et al.*, 2007).

A subclasse 2 de transposons de DNA é formada pelos *Helitrons* e *Mavericks* que transpõem utilizando um intermediário de DNA fita simples. Os *Helitrons*, encontrados em fungos, animais e plantas, não possuem TIR e não geram TSD (WICKER *et al.*, 2007). Os *Mavericks*, também conhecidos como *Polintons*, têm entre 10 e 20 kb, são flanqueados por longas TIR, e codificam até 11 diferentes proteínas (KAPITONOV & JURKA, 2006).

Assim como os retrotransposons, os transposons de DNA apresentam elementos autônomos e não-autônomos. Os elementos autônomos codificam todos os genes necessários a sua transposição, incluindo o de sua própria enzima transposase. Já os elementos não-autônomos possuem regiões codificadoras degeneradas ou ausentes e por isso não são capazes de sofrer transposição, ao menos que utilizem uma transposase codificada por um elemento relacionado que seja capaz de reconhecer as suas TIR. Os elementos transponíveis não-autônomos são divididos em quatro grupos: LARD, MITE, SNAC e TRIM (FRESHOTTE & PRITHAM, 2007). Dentre estes, os MITE (*Miniature Inverted-repeat Transposable Element*) foram identificados em vários organismos onde podem ser ativados por TE autônomos pertencentes à superfamília *Tc1/Mariner* (WICKER *et al.*, 2007).

Os elementos transponíveis podem causar diversas alterações no genoma do hospedeiro quando se movem pelo genoma ou servindo como sítio para recombinação. Entre as modificações que podem ser causadas por elementos móveis podem ser citadas: alterações na expressão gênica se os transposons inserirem-se em regiões promotoras, bloqueando a expressão ou alterando a

regulação do gene; a transcrição gênica pode ser afetada, pois durante a excisão os transposons deixam uma “pegada”, alterando o produto gênico ou a fase de leitura do gene; mudanças cromossômicas estruturais, como deleções, translocações, duplicações e inversões, devido à recombinação homóloga entre elementos de uma mesma família; e ampliações de segmentos de DNA, produzindo pseudogenes (DABOUSSI & CAPY, 2003; FRESCHOTTE & PRITHAM, 2007). Desta maneira, os TE são responsáveis pela geração da diversidade genética e possuem grande influência na trajetória evolutiva dos organismos.

1.1.5. Transposons de DNA – mecanismos do tipo “cortar e colar”

A região codificadora de transposons de DNA é formada por uma ORF, geralmente ininterrupta, que codifica para a enzima transposase (BRILLET *et al.*, 2007). Esta enzima, juntamente com as TIR, participa de uma série de eventos moleculares que culminam na excisão do elemento e sua reintegração em um *locus* diferente. As TIR dos transposons de DNA variam em tamanho e contém sítios de ligação para a transposase, portanto, a presença de uma cópia completa é necessária para que ocorra a transposição. Além dos sítios de ligação da transposase, as TIR apresentam um *motif* de clivagem em suas extremidades que são necessárias somente para excisão do elemento (PLASTERK *et al.*, 1999). A especificidade da interação TIR - transposase baseia-se na sequência da TIR e na configuração do domínio de ligação ao DNA, que são específicos para cada elemento, impedindo a reação cruzada entre elementos diferentes (BRILLET *et al.*, 2007).

O mecanismo de transposição dos transposons de DNA inicia-se com a transcrição de um mRNA pela maquinaria da célula hospedeira, que serve como molde para a síntese da enzima transposase, codificada pelo próprio transposon. A transposase é constituída de dois domínios, um C-terminal catalítico, responsável pelas reações de clivagem do DNA, e um N-terminal que corresponde ao domínio de ligação ao DNA. O domínio C-terminal contém um *motif* de aminoácidos ácidos

DDx[D/E] onde x representa o número de resíduos de aminoácidos, que varia de 34 a 41 (BRILLET *et al.*, 2007). O domínio N-terminal pode ser formado por um ou dois *motifs* HTH (*Helix-Turn-Helix*), sendo que quando há dois *motifs* HTH estes são separados por um *motif* GRPR (glicina, arginina, prolina, arginina). Em algumas transposases a região de dobradiça entre o domínio catalítico (DDD ou DDE) e o domínio de ligação ao DNA (HTH) contém um sinal de localização nuclear (NLS - *Nuclear Localization Signal*) (PLASTERK *et al.*, 1999; BRILLET *et al.*, 2007) (ver domínios característicos no esquema da figura 4).

As reações de transposição dos elementos da classe II requerem a formação de um complexo de DNA-proteína, o transposossomo, antes da clivagem e transferência do DNA. Para a formação do transposossomo são necessários dois ou quatro monômeros da transposase, dependendo do número de sítios de ligação nas TIR. Os *motifs* HTH do domínio de ligação ao DNA de cada monômero reconhecem uma sequência específica na TIR a qual se ligam. Estes monômeros se dimerizam na presença de íons divalentes de metal, tornando o complexo ativo para as reações de clivagem, removendo o DNA do sítio doador e mantendo-o em uma conformação estável. A clivagem ocorre através da hidrólise das ligações fosfodiéster entre o transposon e o DNA flanking, liberando resíduos 3'-OH que realizam um ataque nucleofílico para a ligação ao sítio alvo. O transposossomo reconhece a região de inserção formando um complexo instável de captura que em seguida é convertido em um complexo mais estável. As extremidades 3'-OH da fita de DNA que está sendo transferida atacam ambas as fitas do DNA alvo e o transposossomo se desassocia. A inserção do transposon forma pequenos *gaps* coesivos nas fitas do sítio alvo, que são reparadas pela maquinaria da célula hospedeira, formando as duplicações no sítio alvo (TSD) (BRILLET *et al.*, 2007)

O reparo do sítio doador também é realizado pela maquinaria do hospedeiro. Quando o transposon sofre excisão pela ação da transposase é formada uma quebra na dupla fita do DNA que pode ser reparada por meio de recombinação homóloga ou não-homóloga. A recombinação não-homóloga é a via de reparo predominante para quebras de DNA induzidas por transposons, entretanto, na

ausência dos fatores necessários, a recombinação homóloga também participa do processo (MISKEY *et al.*, 2005).

1.1.6. Elementos transponíveis em fungos

Os elementos transponíveis podem ser encontrados nos fungos pertencentes aos filos Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota e representam de 3 a 20% do genoma em diversos fungos filamentosos (DABOUSSI & CAPY, 2003). De acordo com WICKER e colaboradores (2007) todas as ordens de retrotransposons podem ser encontradas nos fungos e os transposons de DNA são comuns nos fungos filamentosos, mas ocasionalmente ocorrem em leveduras, como *Candida albicans*. Os transposons de DNA encontrados em fungos pertencem às ordens dos *Helitrons* e *Mavericks* e a seis das nove superfamílias da ordem TIR, cujo mecanismo pode ser descrito como “cortar e colar” (FRESCHOTTE & PRITHAM, 2007). Além disso, um grupo de elementos móveis, aparentemente um transposon de DNA, denominado *Crypton* foi descrito apenas em fungos (DABOUSSI & CAPY, 2003).

A maioria dos transposons de DNA descritos em fungos pertence à superfamília *Tc1/mariner*, que é a mais distribuída na natureza (MISKEY *et al.*, 2005). Estes elementos têm entre 1.3 e 2.4 Kb, com TIR de tamanhos variados e o sítio de inserção é o dinucleotídeo TA. Estes elementos são pouco presentes nos genomas de plantas e em animais, mas parecem ser prevalentes entre os fungos, onde muitos permanecem ativos (PLASTERK *et al.*, 1999; DABOUSSI & CAPY, 2003).

Em fungos fitopatogênicos, principalmente nos que não possuem ciclo sexual ou que consistem de populações clonais, a distribuição desigual e variações no número de cópias de transposons têm sido observadas. O elemento *Fot1* é distribuído de forma desigual no complexo de espécies de *Fusarium oxysporum*, sendo que diferentes linhagens de *F. oxysporum* podem ser distinguidas por padrões de *fingerprinting* através do uso de seqüências dos elementos *Fot1* como sondas para *Southern Blot* (CHIOCCHETTI *et al.*, 1999; DABOUSSI *et al.*, 2001).

Hua-Van e colaboradores (2001) identificaram cinco subfamílias do elemento *impala* presentes na maioria das linhagens de *F. oxysporum* testadas. A presença de cópias semelhantes do elemento, localizadas na mesma região genômica foi observada em linhagens próximas, demonstrando que o elemento *impala* pode ser usado como marcador para estabelecer relações filogenéticas dentro de *F. oxysporum* (HUA-VAN *et al.*, 2001).

Elementos transponíveis também podem ser responsáveis por mudanças no padrão cromossômico de espécies fúngicas. Em *F. oxysporum* existe uma correlação entre o alto nível de polimorfismo cromossomal e a concentração de elementos transponíveis, o que sugere que a variação cariotípica em *F. oxysporum* é resultado da recombinação entre diferentes cópias de transposons (DAVIÉRE *et al.*, 2001). Recentemente, Ma e colaboradores (2010) observaram regiões genômicas linhagem-específicas, ricas em transposons e genes com perfis evolutivos distintos no genoma de linhagens de *F. oxysporum*. Assim, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *F. solani* possuem cromossomos distintos em relação a seqüências repetitivas e genes envolvidos nas interações patógeno-hospedeiro que geralmente estão ausentes no genoma de linhagens não-patogênicas. Experimentalmente foi realizada a transferência horizontal de um cromossomo inteiro entre dois membros isolados geneticamente de *F. oxysporum*, demonstrando a aquisição de patogenicidade hospedeiro-específico e que esta transferência pode ser determinada por vários fatores, incluindo tamanho e conteúdo de transposons.

Monroy e Sheppard (2005) utilizaram o elemento *Taf1* da superfamília *mariner* para tipagem de linhagens de *Aspergillus fumigatus*. Sete isolados clínicos foram analisados por *Southern Blot*, tendo *Taf1* como sonda. Foi observado que cada isolado tinha um padrão de bandas específico, sugerindo que as inserções de *Taf1* são polimórficas entre diferentes linhagens de *A. fumigatus* e que o elemento poderia ser um excelente candidato à identificação de linhagens únicas do fungo por técnicas de *fingerprinting* (MONROY & SHEPPARD, 2005).

O conhecimento da presença de elementos móveis no genoma de *Paracoccidioides* é incipiente. Felipe e colaboradores (2003) na descrição do transcriptoma parcial de *P. brasiliensis*, identificaram oito diferentes grupos de

retrotransposons, sendo relatadas entre as seqüências de cDNA mais abundantes referidas, então, apenas como elementos *Ty-like*. Nos últimos anos, o Laboratório de Biologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG, vem desenvolvendo uma linha de pesquisas cujo objetivo geral é a identificação e caracterização de elementos genéticos móveis, transposons e retrotransposons, no genoma de *Paracoccidioides*. Araújo e colaboradores (2008) caracterizaram dois retrotransposons majoritariamente transcritos do fungo, denominados RTPb1 e RTPb2. RTPb1 foi caracterizado como um LTR-retrotransposon, *Gypsy-like*, e o elemento RTPb2 foi caracterizado como um retrotransposon não-LTR *LINE-like*. Ambos os elementos foram encontrados nos três isolados sequenciados, denominados Pb01, Pb03 e Pb18, porém o número de cópias completas, por exemplo, do RTPb1, foi bastante distinto entre os isolados, tendo-se observado uma cópia completa não truncada em Pb03 enquanto que em Pb01 e Pb18 observaram-se 13 e 14 cópias (ARAÚJO, 2008). Análises em *Southern blot* do DNA genômico dos três isolados também indicaram a presença de múltiplas cópias de ambos os elementos. Análises em *Northern blot* revelaram a presença de transcritos com tamanhos em torno de 5 kb, para cada um dos retrotransposons no RNA total da forma de levedura em Pb18 e Pb01, enquanto que em um outro isolado (B399), foi observada a presença de transcritos apenas para o RTPb1 (transcritos com 3Kb e 1,5 kb) e visualizados apenas no RNA total da fase micelial.

De acordo com Desjardins e colaboradores (2011) os três genomas de *Paracoccidioides* contém todos os tipos básicos de elementos transponíveis (TABELA 1). Os transposons constituem aproximadamente de 8-9% do genoma de Pb03 e Pb18, respectivamente, e 16% do genoma de Pb01. Dois tipos de elementos da Classe I (retrotransposons), LTR e LINE estão presentes nos três genomas, entretanto, elementos SINE não foram detectados e existe o dobro de elementos LTR em *P. lutzii* (Pb01) do que em Pb18 e Pb03 (*P. brasiliensis*). O repertório de elementos da Classe II em *P. brasiliensis* inclui as famílias *Mariner*, *hAT*, *Fot* e *Ant1*, sendo achados em menor número de cópias em *P. lutzii* (DESJARDINS *et al.*, 2011). Entretanto, *P. lutzii* possui um novo tipo de elemento *Tc1*, que está ausente em Pb18 e Pb03 (TABELA 1) cuja a sequencia é similar a do elemento Impala de

Fusarium spp (DESJARDINS *et al.*, 2011). Repetições de baixa complexidade são mais frequentes em *P. lutzii* em relação a Pb03 e Pb18, pois *P. lutzii* possui 50% a mais de repetições ricas em AT de baixa complexidade. Esta maior quantidade de repetições de baixa complexidade e de elementos transponíveis em *P. lutzii* contribui para o acréscimo de 3Mb no tamanho de seu genoma (DESJARDINS *et al.*, 2011).

Recentemente, Marini e colaboradores (2010) encontraram oito famílias de transposons de DNA no genoma do fungo *Paracoccidioides*. Neste trabalho foi realizada uma ampla busca por transposons de DNA no genoma dos isolados Pb01 (*P. lutzii*), Pb03 (*P. brasiliensis* PS2) e Pb18 (*P. brasiliensis* S1). Foram encontradas 1332 sequências com similaridade a transposons de DNA, das quais 464 foram classificadas. A análise dos elementos classificados permitiu a identificação, com base na sequência de nucleotídeos e organização estrutural, em oito diferentes famílias de transposons de DNA, pertencentes à superfamília *Tc1/mariner* (65 a 80% de identidade), denominadas de Trem A-H (abreviação de *Transposable element mariner*) (FIGURA 4).

Tabela 1. Composição de elementos repetitivos no genoma de *Paracoccidioides*.
Fonte: DESJARDINS *et al.*, 2011.

Tipo	<i>P. lutzii</i> (Pb01)	<i>P. brasiliensis</i> (Pb03)	<i>P. brasiliensis</i> (Pb18)
DNA	2	10	10
DNA/TcMar	19	15	19
DNA/TcMar-Ant1	1	2	2
DNA/TcMar-Fot1	284	387	417
DNA/TcMar-Mariner	3	3	2
DNA/TcMar-Tc1	1	0	0
LINE	5	8	8
LINE/Tad1	82	62	88
LTR	277	101	124
LTR/Copia	165	80	41
LTR/Gypsy	442	85	199
Total de elementos	1281	753	910
Porcentagem	15,9%	7,7%	9,2%

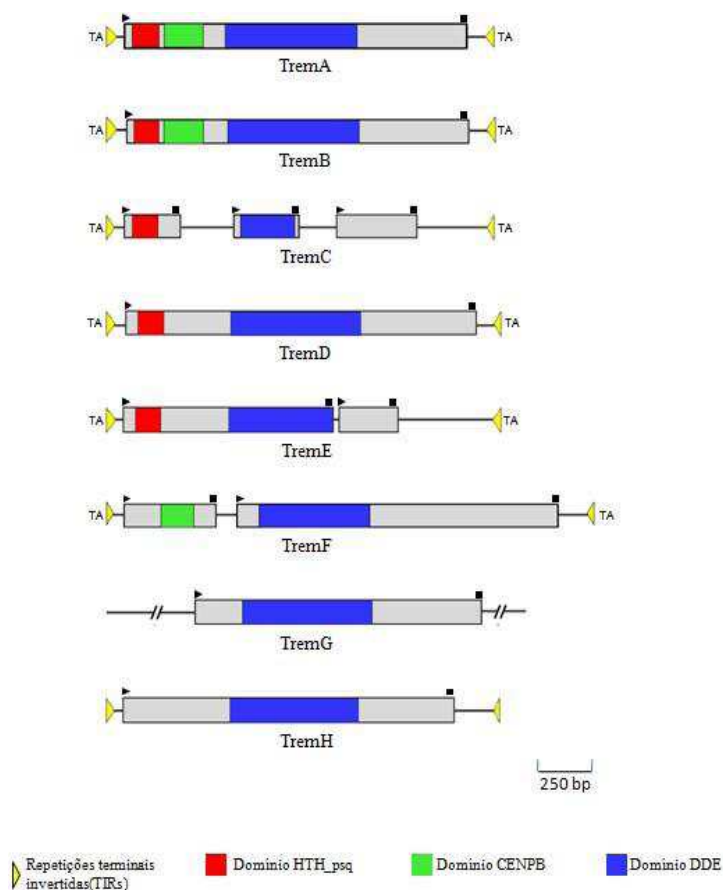


Figura 4. Estrutura e organização dos transposons de DNA de *Paracoccidioides*. Representação esquemática da seqüência consenso dos oito transposons de DNA identificados. As caixas cinza representam ORF (*Open Read Frames* – Janelas abertas de leitura), com o ► representando o códon inicial ATG e ■ o stop códon. As caixas vermelhas representam o domínio conservado de ligação ao DNA *Helix-Turn-Helix_pipsqueak* (HTH_psq), as caixas verdes o domínio CENPB (*Centromere Binding domain* – domínio de ligação ao centrômero), as caixas azuis o domínio conservado DDE e os triângulos amarelos representam as repetições terminais invertidas. **Fonte: MARINI et al., 2010.**

Os elementos TremA, B e D apresentaram cópias com ORF íntegras que codificam putativas transposases, indicando que estes elementos podem ser autônomos. Os outros elementos (TremC, E, F, G e H) apresentam cópias com ORFs truncadas, constituindo elementos não autônomos (FIGURA 4). Os elementos Trem estão distribuídos de forma desigual no genoma dos três isolados recentemente sequenciados (Pb01, Pb18 e Pb03) que foram utilizados no estudo *in silico*.

Os elementos TremC e H foram encontrados em Pb01, Pb18 e Pb03; os elementos TremA, B, F e G figuraram em Pb03 e Pb18; o elemento TremD foi observado apenas em Pb18; e o elemento TremE foi exclusivo de Pb01. Ampliou-se a pesquisa da presença de elementos Trem em 17 isolados clínicos e um ambiental do fungo, constatando-se a tendência de manutenção destes padrões no DNA genômico em isolados filogeneticamente relacionados: o elemento TremE foi encontrado apenas nos isolados representativos de *P. lutzii*; os elementos TremA, TremB e TremF nos isolados de *P. brasiliensis* S1 e PS2, e o elemento TremD apenas em *P. brasiliensis* S1.

O mapeamento físico dos elementos TremA e TremB pelas técnicas de *Chromoblot* e *Southern Blot* apontou a presença de múltiplas cópias com distribuição polimórfica nos isolados denominados Pb03 e Pb18 e corroborou os dados obtidos *in silico* indicando a ausência destes elementos no genoma de Pb01 (MARINI *et al.*, 2010). Assim, os elementos Trem parecem ser bons candidatos para o reconhecimento de linhagens e espécies do gênero *Paracoccidioides*.

Dessa forma, tornou-se interessante a possibilidade de ampliarem-se os estudos de identificação e caracterização de elementos móveis e repetitivos no genoma de fungos do gênero *Paracoccidioides*. O conhecimento dos elementos genéticos móveis poderá contribuir para a compreensão da biologia do fungo relacionada à recombinação e variação genética, estrutura, organização e funcionalidade do genoma.

1.2.JUSTIFICATIVA

Em *Paracoccidioides*, o polimorfismo genético foi extensamente demonstrado por meio de diferentes técnicas como RAPD, RFLP, PFGE e sequenciamento gênico. Trabalhos recentes, baseados na análise de múltiplos locus gênicos, revelaram a possibilidade de existência de pelo menos duas espécies do gênero *Paracoccidioides*. Apesar das diferenças descritas entre as quatro espécies filogenéticas de *P. brasiliensis*, todas são isolados clínicos, portanto, se mostram capazes de induzir doença em humanos e em tatus e, conseqüentemente, a habilidade de causar doença não pode ser utilizada para a identificação da espécie filogenética.

Entender melhor a diversidade de isolados do gênero *Paracoccidioides* e definir espécies significa compreender de forma mais abrangente a dinâmica populacional, as diferentes formas clínicas e a importância de se considerar o agente da paracoccidioidomicose como um complexo de genótipos que devem ser levados em conta no diagnóstico e provavelmente nas medidas terapêuticas. Definir variedades, agrupamentos genéticos e, principalmente espécies, é essencial não somente para um estudo biológico, mas no caso de *Paracoccidioides*, para um correto diagnóstico e tratamento da PCM.

Os marcadores moleculares descritos até o momento baseiam-se em técnicas de sequenciamento e análises filogenéticas de multilocus gênicos, dependendo tempo e significando custos. Desta forma, existe a necessidade de conhecerem-se marcadores moleculares precisos, de fácil utilização e capazes de distinguir entre as quatro espécies filogenéticas do gênero *Paracoccidioides*.

Nosso laboratório tem-se dedicado ao estudo de elementos móveis e repetitivos no genoma do fungo. Recentemente, foram descobertas oito famílias de transposons de DNA, pertencentes à superfamília *Tc1/mariner*. Os elementos Trem estão distribuídos de forma desigual no genoma de isolados representativos de três espécies filogenéticas de *Paracoccidioides* (*P. lutzii*; PS2 e S1), sendo dois elementos (TremC e H) encontrados em todas as espécies, quatro (TremA, B, F e G) nas espécies filogenéticas PS2 e S1, TremD apenas em S1 e TremE em *P. lutzii*.

Análises do padrão cromossomal e da distribuição de elementos transponíveis têm sido empregadas na identificação de linhagens e de diferentes gêneros e espécies fúngicas e para o estabelecimento de relações filogenéticas. Pouco se sabe, sobre a presença dos elementos Trem em isolados ambientais e em isolados representativos da espécie filogenética PS3. Além disso, não se sabe a respeito da presença do elemento TremG em isolados do gênero *Paracoccidioides*. O estudo de elementos transponíveis, pode ser útil na compreensão do processo evolutivo, bem como para avaliar a diversidade genética observada entre os diversos isolados do fungo.

Um dos grandes benefícios do estudo de elementos transponíveis em *Paracoccidioides* é o conhecimento da estrutura genética de seus diferentes isolados clínicos e ambientais. Uma vez que pertencem a linhagens filogenéticas distintas e morfológicamente não distinguíveis, o uso de elementos móveis pode ser útil na caracterização de grupos filogeneticamente e epidemiologicamente relacionados.

Desta forma, este trabalho se propôs avaliar marcadores moleculares já descritos na literatura e ampliar o estudo da possível aplicação dos elementos Trem para a distinção entre as espécies filogenéticas no gênero *Paracoccidioides*.

2.OBJETIVOS

2.1.Objetivo geral

Avaliar a aplicabilidade das sequências correspondentes aos elementos Trem, transposons de DNA da superfamília *Tc1-mariner*, como marcadores moleculares capazes de discriminar espécies filogenéticas do gênero *Paracoccidioides*.

2.2.Objetivos específicos

- Determinar a espécie filogenética de cada isolado empregando marcadores e métodos previamente descritos na literatura.
- Investigar a presença dos elementos Trem A-H em múltiplos isolados clínicos e ambientais de *Paracoccidioides* de diferentes origens geográficas.
- Avaliar o perfil de distribuição das oito famílias de elementos Trem nos diferentes isolados agrupados de acordo com a espécie filogenética.

3.METODOLOGIA

3.1.Microrganismos

Foram utilizados múltiplos isolados de fungos do gênero *Paracoccidioides*, representativos das quatro espécies filogenéticas, previamente caracterizados (TABELA 2) e isolados não caracterizados segundo a espécie filogenética (TABELA 3).

3.2.Manutenção dos isolados

Os isolados foram mantidos na fase micelial com repiques mensais, e a fase leveduriforme (L), quando necessário, foi induzida ao crescimento a 37°C, e mantida com repiques semanais, ambas em tubos inclinados de ágar YPD (Extrato de levedura 5 g; Peptona de caseína 5 g; Dextrose 15 g; Ágar 15 g; Água bidestilada 1litro, para meio sólido; pH 7,0).

3.3.Extração de DNA genômico do fungo

A extração do DNA total foi realizada de acordo com Girardin & Latgé (1994), com modificações. Para a obtenção de massas celulares, os isolados do fungo foram previamente convertidos à fase L, por meio de três subcultivos sucessivos em ágar YPD, com intervalos de 5 em 5 dias, para indução de crescimento exponencial (SAN-BLAS, 1994). Posteriormente, os isolados em fase L foram cultivados em caldo YPD, a temperatura de 37°C, sob constante agitação (120 dpm), por 7 dias. Após esse período, o cultivo foi interrompido, as massas leveduriformes foram centrifugadas a 8000 g por 10 min, a 4°C e lavadas 3 vezes em PBS 1x por 5 min.

Aproximadamente 300 mg de massa celular, foi macerada na presença de nitrogênio líquido em um gral de porcelana esterilizado, até obtenção de um fino pó, não permitindo seu descongelamento durante a maceração. A massa celular

macerada foi transferida para um tubo de 2 ml contendo 800 µl de tampão de lise e 8 µl de proteinase K (10 mg/µl) e incubada a 65°C por 10 min. Logo após foram adicionados 600 µl de fenol e 200 µl de clorofórmio, sob agitação, até a obtenção de uma suspensão homogênea. A suspensão foi centrifugada a 13.000 rpm por 1 h a 8°C e a fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo de 2 ml. Foram adicionados 800 µl de clorofórmio, seguido de centrifugação a 13.000 rpm por 10 min a 8°C. A fase aquosa foi então transferida para um novo tubo contendo 12 µl de solução de RNase A (10 mg/µl) e incubado por 2 h à 37°C. Após a incubação foi adicionado igual volume de clorofórmio e a suspensão foi agitada e centrifugada a 13.000 rpm por 10 min. A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo de 2 ml. O DNA foi precipitado com 840 µl de isopropanol e 40 µl de NaCl 4 M (0,2 mM NaCl final), solubilizado em 100 µl de tampão TE e mantido a -20°C.

A avaliação qualitativa do DNA foi realizada por meio de eletroforese convencional em agarose a 0,8%, em TBE, a 70 V, por 1 h e a concentração do DNA, foi determinada através da leitura de OD a 260 nm em espectrofotômetro.

Tabela 2. Lista de isolados previamente caracterizados segundo a espécie filogenética utilizados neste trabalho.

Isolado	Origem	País	Espécie Filogenética
Pb01^{a c d}	Clínico	Brasil-Goiás	<i>P. lutzii</i>
Ed01^e	Clínico	Brasil-Goiás	<i>P. lutzii</i>
1578^e	Clínico	Brasil-Goiás	<i>P. lutzii</i>
8334^g	Clínico	Brasil-Goiás	<i>P. lutzii</i>
JMS^g	Clínico	Brasil-Mato Grosso	<i>P. lutzii</i>
JHS^g	Clínico	Brasil-Mato Grosso	<i>P. lutzii</i>
MFC^g	Clínico	Brasil-Mato Grosso	<i>P. lutzii</i>
MND^g	Clínico	Brasil-Mato Grosso	<i>P. lutzii</i>
PLR01^g	Clínico	Brasil-Rondônia	<i>P. lutzii</i>
ROSC^g	Clínico	Brasil-Rondônia	<i>P. lutzii</i>
Pb03^{a b}	PCM-Crônica	Brasil-São Paulo	PS2
1925 (Pb2)^b	PCM-Crônica	Venezuela	PS2
1017 (Pb4)^b	PCM-Crônica	Brasil-São Paulo	PS2
Pb18^{a b}	PCM-Crônica	Brasil-São Paulo	S1
Peru (Pb10)^b	PCM-Aguda	Peru	S1
470 (Pb14)^b	PCM-Aguda	Brasil-São Paulo	S1
B339^b	PCM-Crônica	Brasil-São Paulo	S1
Mg4 (Pb6)^b	PCM-Crônica	Brasil-Paraná	S1

Tabela 2. Continuação.

Mg5 (Pb11)^b	PCM-Aguda	Brasil-Paraná	S1
Útero^b	PCM-Crônica	Argentina	S1
AP (Pb5)^e	PCM-Crônica	Brasil-Paraná	S1
SS (Pb13)^b	PCM-Aguda	Brasil-Goiás	S1
Pinguim (EPM34)^b	Fezes de pinguim	Uruguai	S1
Tatu (EPM04)^b	Tatu	Brasil-Pará	S1
924 (Pb9)^b	PCM-Crônica	Brasil-São Paulo	S1
9673 (Pb8)^b	PCM-Crônica	Brasil-São Paulo	S1
63265 (EPM51)^e	PCM-Aguda	Argentina	S1
Pb09 (EPM26)^b	Clínico	Venezuela	S1
EPM 77 (JOA80)^f	Clínico	Colômbia	PS3
EPM 83^f	PCM-Crônica	Colômbia	PS3

^a Isolados utilizados no projeto de sequenciamento genômico – *Broad Institute* MIT

^b Isolados caracterizados por Matute *et al.* (2006a); ^c Carrero *et al.* (2008); ^d Teixeira *et al.* (2009); ^e Marini *et al.* (2010); ^f Theodoro *et al.* (2008)

^g Isolados caracterizados e cedidos por Marcus Teixeira (UnB)

Tabela 3. Lista de isolados não caracterizados segundo a espécie filogenética utilizados neste trabalho.

Isolado	Origem	País
EPM59^h	PCM-Crônica	Venezuela-Caracas
EPM62^h	PCM-Aguda	Venezuela-Caracas
EPM69 (Pb301)^h	PCM-Crônica	Venezuela-Caracas
EPM81 (MS-Col)^h	Clínico	Colômbia-Medélin
EPM82^h	PCM-Crônica	Colômbia-Bogotá
EPM87 (Pb320)^h	Osso Criança	Argentina-Entre Rios
EPM92 (PbJMS)^h	Clínico	Brasil-Piauí
EPM97 (Mg7)^h	PCM-Crônica	Brasil-Maringá
EPM101 (T1)^h	Tatu	Brasil-Ibiá
EPM102 (T2)^h	Tatu	Brasil-Ibiá
EPM117^h	Tatu	-
EPM141 (Pb77)^h	Clínico	Brasil-Paraná
Pb29ⁱ	Clínico	Brasil-Espírito Santo
Pb156ⁱ	Clínico	Brasil-Espírito Santo
2195^j	Clínico	Brasil-Mato Grosso
2202^j	Clínico	Brasil-Mato Grosso
2226^j	Clínico	Brasil-Mato Grosso
2422^j	Clínico	Brasil-Mato Grosso

^hIsolados cedidos pelo Dr. Zoilo de Camargo (UNIFESP)

ⁱIsolados cedidos pela Dra. Mariceli Araújo (UFES)

^jIsolados cedidos pela Dra. Rosane Hahn (UFMT)

3.4. Caracterização dos isolados de *Paracoccidioides* segundo a espécie filogenética por meio de *Polimerase Chain Reaction* (PCR)

O DNA genômico de diferentes isolados de *Paracoccidioides* (TABELAS 2 e 3) foram submetidos a PCRs empregando diversos iniciadores descritos como capazes de caracterizar algumas das espécies filogenéticas conhecidas no gênero. Cinco marcadores microssatélites de DNA foram utilizados buscando discriminar entre isolados S1, PS2 e PS3 de *P. brasiliensis* (MATUTE *et al.*, 2006b). Para diferenciar isolados da espécie *P. lutzii* de *P. brasiliensis*, foi utilizado um par de iniciadores destinados à região de indel do gene *hsp70* (TEIXEIRA *et al.*, 2009). Iniciadores baseados na sequencias dos elementos Trem A-H (MARINI *et al.*, 2010) foram utilizados como marcadores neste trabalho com o objetivo de discriminar entre as quatro espécies filogenéticas do fungo. É importante ressaltar que todas as PCRs foram feitas em duplicata para cada isolado.

3.4.1. Indel do gene *hsp70*

Para a caracterização de isolados pertencentes à espécie *P. lutzii* foi utilizada a região 5' – UTR até o íntron 1 do gene *hsp70* para amplificação por PCR de acordo com Teixeira e colaboradores (2009). O par de iniciadores utilizado foi: HSPMMT1 (5'AACCAACCCCCTCTGTCTTG3') e PLMMT1 (5'GAAATGGGTGGCAGTATGGG3'). Foram utilizados todos os quarenta e oito isolados referidos nas tabelas 2 e 3. A cada tubo de reação foram adicionados os seguintes reagentes: 0,2 mM de dNTP; 0,2 µM de cada iniciador senso e anti-senso; 1,5 mM MgCl₂; 20 mM de tampão Tris-HCl ph 8,4 e 50 mM KCl; 0,3U de Taq DNA Polimerase PhNeutria (5 U/µl) e 10 ng de DNA genômico, para um volume final de 20 µl. O material foi homogeneizado e incubado em termociclador *Gradient Vapo Protect* (Eppendorf), programado da seguinte forma: 94°C por 5 minutos; 30 ciclos a 94°C por 1 minuto; 65°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; 72°C por 5 minutos. Os

produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

3.4.2. Microsatélites de DNA

Quarenta e oito isolados (TABELAS 2 e 3) foram utilizados para caracterização das espécies filogenéticas S1, PS2 e PS3 através de cinco marcadores destinados à amplificação de diferentes microsatélites de DNA (MATUTE *et al.*, 2006b). A tabela 4 mostra o par de marcadores utilizados para identificar cada espécie filogenética de *P. brasiliensis*. Para que um determinado isolado seja caracterizado como S1, o marcador PBMS4 deve amplificar juntamente com um (ou todos) dos outros marcadores (PBS1, PBMS2, PBMS3 ou PBMS5). Para que um determinado isolado seja PS2, os marcadores PBMS2 e PBMS3 devem amplificar. No caso de um isolado pertencer a espécie PS3, o marcador PBMS1 deve amplificar juntamente com o PBMS2 e/ou PBMS5. As sequências dos iniciadores e temperaturas de anelamento se encontram descritos na tabela 5. A cada tubo de reação foram adicionados os seguintes reagentes: 0,2 mM de dNTP, 0,5 µM de cada iniciador senso e anti-senso, 20 mM de tampão Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl, 0,3U de Taq DNA Polimerase PhoNeutria e 5-10 ng de DNA genômico. O material foi homogeneizado e incubado em termociclador *Gradient Vapo Protect* (Eppendorf), programado da seguinte forma: 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de: 94°C por 1 minuto; à temperatura de anelamento de cada iniciador por 1 minuto e a 72°C por 1 minuto; 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Tabela 4. Padrões de amplificação para os pares de marcadores microssatélites de DNA que caracterizam as espécies filogenéticas de *Paracoccidioides brasiliensis*.

Fonte: Matute et al., 2006b

Espécie Filogenética	Marcadores	Padrão esperado
S1	PBMS1 e PBMS4	Amplificação de todos os marcadores para S1.
	PBMS2 e PBMS4	
	PBMS3 e PBMS4	
	PBMS5 e PBMS4	
PS2	PBMS2 e PBMS3	Amplificação apenas dos marcadores PBMS2 e PBMS3 para PS2.
PS3	PBMS1 e PBMS2	Amplificação apenas dos marcadores PBMS1, PBMS2 e PBMS5 para PS3.
	PBMS1 e PBMS5	

Tabela 5. Sequências de iniciadores, tamanho do produto amplificado, e temperatura de anelamento de cada marcador microssatélite. **Fonte: Matute *et al.*, 2006b (adaptado).**

Marcador	Sequência de Oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento (°C)	Produto da PCR (pb)	Sequência Repetitiva
PBMS1	5'CCACCCTGGCGAGGAAGACCCC3' 3'GCTTCCACGTTGGATCAGGTGC5'	59	530	T
PBMS2	5'TGCCCCGAAGCAGCCCCCGGG3' 3'GAGAAAGTGAGTTGGTTTACG5'	58	198	TAAA
PBMS3	5'TGTCTAAGAGGACCGACCACG3' 3'GTGCCAGTGCATCATGAACAG5'	58,5	388	GAAA
PBMS4	5'TCGTCGAACCTCTTGTGAAGG3' 3'TGAGGGAAGCACGCAGAACGC5'	57,4	368	AC
PBMS5	5'TTTGCTACACTTCCCTCTCCC3' 3'CTTCCCCCATTCTGATTCTCG5'	61	395	AT

3.4.3.Elementos transponíveis

3.4.3.1. *TremA,B,C,D,E,F e H*

O DNA genômico de trinta isolados de *Paracoccidioides* foram submetidos à amplificação das TIRs de cada elemento Trem por PCR, segundo Marini e colaboradores (2010). A cada tubo de reação foram adicionados os seguintes reagentes: 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂ (50 mM), 20 mM de tampão Tris-HCl ph 8,4 e 50 mM KCl, 100 pmol de cada iniciador, 20 ng de DNA genômico, 0,3 U de Taq DNA Polimerase PhNeutria (5 U/μl) e água para um volume final de 20 μl. Os iniciadores e suas respectivas sequências e temperaturas de anelamento estão relacionados na tabela 6. O material foi homogeneizado e incubado em termociclador *Gradient Vapo protect* (Eppendorf), programado da seguinte forma: 94°C por 5 minutos; 30 ciclos a 94°C por 1 minuto; a temperatura de anelamento de cada iniciador por 30 segundos; e 72°C por 1 minuto; 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Tabela 6. Iniciadores destinados as TIR de cada elemento Trem e suas respectivas temperaturas de anelamento. **Fonte: Marini *et al.*, 2010.**

Iniciador	Sequência de Oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento (°C)	Produto da PCR (pb)
TIR TremA	5'TAGTCCGACACCTAACCGATC3'	55	1850
TIR TremB	5'TAACCAATCACTCAACTGGCC3'	55	1857
TIR TremC	5'ACGTAATCAATAAGCGAGTCG3'	52	1869
TIR TremD	5'TCCACAAGCGAGCGGGCCA3'	65	1891
TIR TremE	5'GTAATTCCACACCGAGTCG3'	53	1883
TIR TremF	5'TAAACCGCCACACAACGCAC3'	59	2329
TIR TremH	5'CCACACCAAAAACGATAAAAACA3'	52	1882

3.4.3.2. TremG

O elemento transponível TremG, descrito por Marini e colaboradores (2010), foi também utilizado neste trabalho. Para a PCR, foi utilizado o par de iniciadores (5'ATGATCTTTGGTGCTGCCA3') e (5'TGGTGGCATTACATAAATGC3') desenhados a partir da região central conservada da sequência consenso do elemento (FIGURA 5). A cada tubo de reação foram adicionados os seguintes reagentes: 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂ (50 mM), 20 mM de tampão Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl, 100 pmol de cada iniciador, 20 ng de DNA genômico, 0,3 U de Taq DNA Polimerase PhNeutria (5 U/μl) e água para um volume final de 20 μl. O material foi homogeneizado e incubado em termociclador *Gradient Vapo protect* (Eppendorf), programado da seguinte forma: 94°C por 5 minutos; 30 ciclos a 94°C por 1 minuto; 55°C por 30 segundos; e 72°C por 1 minuto; 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

ATGATCTTTGGTGCTGCCAAATTTCTACTTGCGCAGAGTCATACYRATCTCACCACACCTCCACCCGGGCTTGGAGA
 GCACTGGGTCAAAGATTCCTTCAAAGTTCATCCRGAGTATAATGTACRCAAGCAAAGACCATTGATATACTGCGGA
 AACAGRCTACCAACCTTCATTCACTTCTTGATTGRTTTAACYGCTTTAAGGAGATAAAAGAGAAGCATGGGATCCAG
 GACTGTGATGTACAACTTTGATGAAACRGGTTTCAGAAATAGGAATYGGCYGTGATCAGTGGATTATAACGCGAGA
 TCCTCRGAGGAGAACCTATGTTGGCAGTTCAAATAACAGRGAAACTCTTACAATCATTGAAGGRATTGCAACTGAYG
 GCTTTACTATCYCTYCTTTATATATTTCTCACTGCAAAGCAGCTACAAGAGYGGTGGACAGATGAAATAGAGAAGRAT
 GCCATGATAGCTACRTCYGACACTGGCTATAATAATGATCAGATCTCTTTTCAATGGATTGAGCACTTYCATCRCTY
 CAYCAAAGCCYGCATCAAAGRAACCCACCGTCTGCTTCTATTAGATGGATTTGATTCTCATTGCACCCTTGAATTTA
 TGACTTTTTGTGACAAGCACAACATCATAYCTTTCTATTTAATTCCTCACACTAGTCATCTTTTACAACCTCTGGAY
 GTTGGTGTTTTTTCAGRCTTTTAAACATCATCATTCTGCGYGCAGTCGAGGAAGCTACRYGAYGTGGTTGTGAGAAGTT
 CACAAAGRTTGAATTTCTTCATGCTATCACCTCTATTYRGAAGCAAYRTTCAAGGTTCATACAATCAAGCAAGGAT
 GGAAGCAACTGGCCTGGTTCCATTCAATCCRTCAGTTGCTCTTAATAAAATTACGTGAGTTTGAATCAACTCCTATG
 GAATCYRAGGGGTCTGTTTCCACYGACTCAGAGACCTGGTATACTCCTTCCACCATACACCAATTCATCRATATAA
 GCGGAAACTGGAGGCTTTGGAGGAGGATGACAACTATGACRCRGACTATATTTATATGGGATTACAAAAGCTTTATA
 AGGGTAGTATTGCAATGGYCAATACAGTGGCTCTTTTGCAAGGAGGAGCTAGCTCAAACCTCTGCTGCCACACTGGCT
 CGAGAACACCRCTCCGCGGCTYGCRGAGGGTGGTTAATAAGGGAGGTGTCATATCCGCAAGCTACTGCCGCAAAAT
 GACRGAATTAATAAGAAGGTTGATATGGAGGAGGCATTGRAGAAAATTGCGGCCAAAATGGAAGAGGGTTATGAAGG
 AACTTAAGAGGTATTGCAGAGATAAAG**GCATTTATGTGAATGCCACCA**AATTTACAAGGAAATCTCAGAGATAA

Par de iniciadores: 5'ATGATCTTTGGTGCTGCCA3' e 5'TGGTGGCATTACATAAATGC3'

Tamanho estimado: 1.357 pb

R = G A (purina)

Y = T C (pirimidina)

Figura 5. Sequência consenso da região conservada do elemento TremG. Os iniciadores *forward* e *reverse* se encontram respectivamente em vermelho e azul e foram desenhados especificamente para a região conservada do elemento. O tamanho esperado pela amplificação com o par de iniciadores de TremG é de 1,3 kb. As letras R e Y respectivamente se referem a possível base nitrogenada purina ou pirimidina.

4.RESULTADOS

4.1.Caracterização de espécies do gênero *Paracoccidioides*: amplificação por PCR de uma região correspondente ao indel do gene *hsp70*

Com o objetivo de identificar isolados da espécie *P. lutzii* dentre os diversos isolados de *Paracoccidioides*, foi utilizado o par de iniciadores HSPMMT1 e PLMMT1, descritos por Teixeira e colaboradores (2009), destinados a amplificar uma região de indel do gene *hsp70* e encontrada no isolado Pb01 e de isolados Pb01-like (*P. lutzii*). Portanto, a amplificação de uma banda de 400 pb identifica o isolado como pertencente à espécie filogenética Pb01-like ou *P. lutzii*. Os resultados obtidos estão apresentados abaixo nos itens 4.1.1 e 4.1.2, que correspondem, respectivamente, ao grupo de isolados cuja espécie filogenética já estava previamente caracterizada por outros autores (TABELA 2) e ao grupo de isolados cuja espécie filogenética era desconhecida (TABELA 3).

4.1.1.Amplificação em isolados cuja espécie filogenética foi previamente caracterizada.

De um total de trinta isolados de *Paracoccidioides* cuja espécie filogenética foi previamente caracterizada (TABELA 2), onze amplificaram uma banda de 400 pb, demonstrando que estes isolados compartilham a região do indel do gene *hsp70* (FIGURA 6). Por meio da PCR empregando os iniciadores HSPMMT1 e PLMMT1, os dez isolados previamente classificados como *P. lutzii* (Pb01, Ed01, 1578, 8334, JHS, JMS, MFC, MND, PLROI e ROSC) tiveram sua classificação confirmada neste trabalho, observando-se a amplificação da banda esperada (400 pb). Contudo, além destes dez, o isolado 63265, previamente caracterizado como *P. brasiliensis* (S1) também apresentou amplificação de uma banda de 400 pb com o par de iniciadores destinados à região de indel (FIGURA 6).

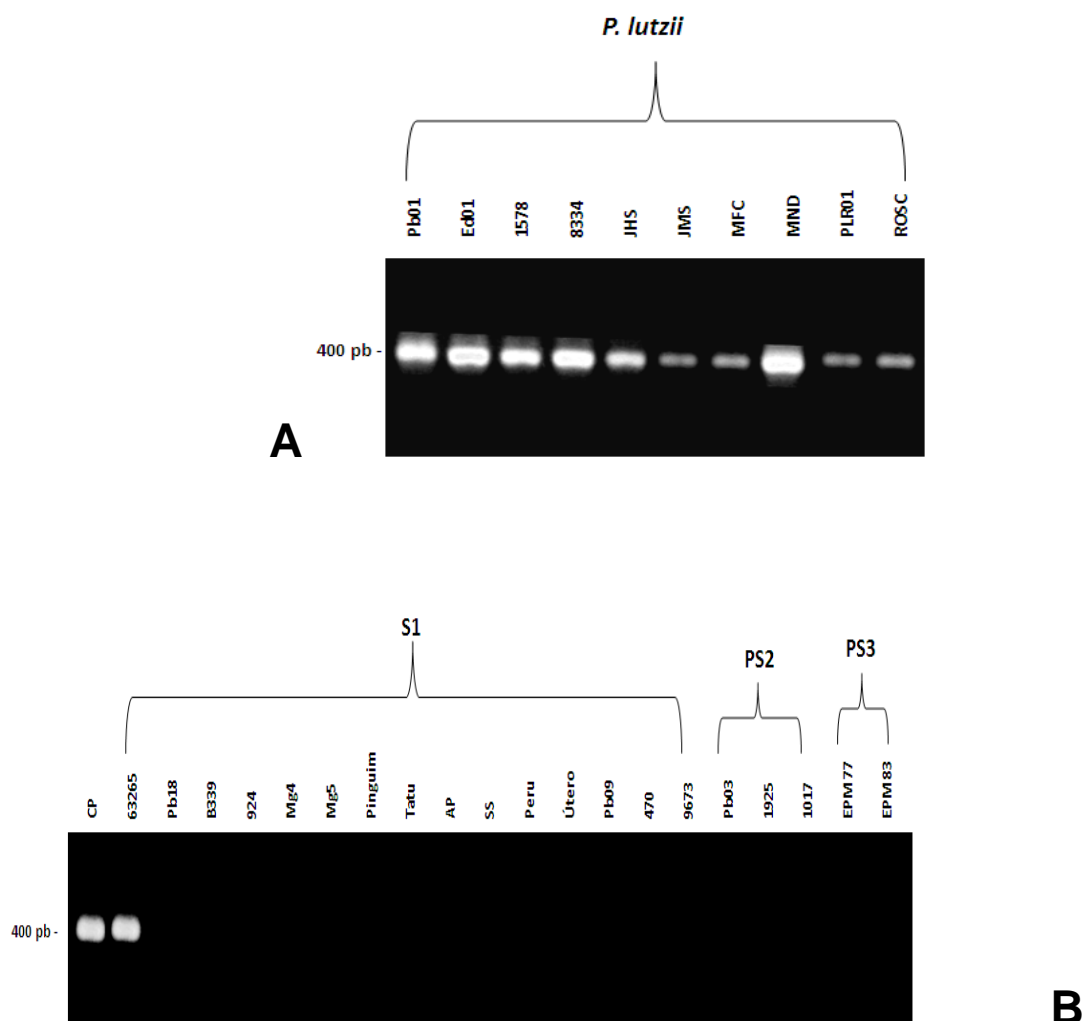


Figura 6. Resolução eletroforética dos produtos obtidos pela amplificação por PCR empregando o par de iniciadores HSPMMT1 e PLMMT destinados à região de indel do gene *hsp70*. Observou-se por eletroforese em gel de agarose 1%, para os dez isolados previamente caracterizados como *P. lutzii*, a amplificação de uma banda de 400 pb a partir do DNA genômico (A). Entretanto, em (B) pode-se observar para o isolado 63265, previamente caracterizado como *P. brasiliensis* S1, a amplificação da banda correspondente a *P. lutzii*. Como controle positivo (CP) das reações foi utilizado DNA do isolado Pb01.

4.1.2. Amplificação da região do indel em isolados cuja espécie filogenética não era conhecida

O DNA genômico de dezoito isolados de *Paracoccidioides* não caracterizados anteriormente segundo a espécie filogenética (TABELA 3) foi também utilizado para reações de PCR dirigidas à região de indel do gene *hsp70* (TEIXEIRA *et al.*, 2009). Deste total, três isolados (2422, 2226 e Pb156) amplificaram uma banda de 400 pb pela utilização dos iniciadores HSPMMT1 e PLMMT (FIGURA 7). Desta forma, os isolados 2422, 2226 e Pb156 foram caracterizados como *P. lutzii*, enquanto os quinze demais isolados foram caracterizados como *P. brasiliensis*. Contudo, restou ainda a necessidade de caracterizá-los quanto à espécie filogenética (S1, PS2 ou PS3).

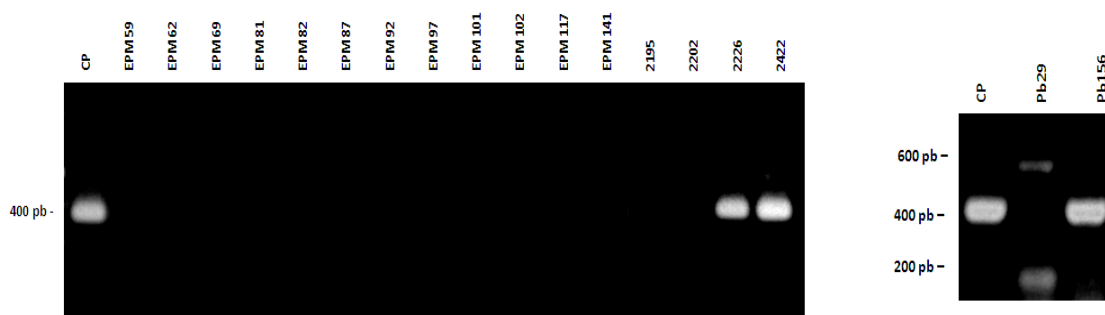


Figura 7. Resolução eletroforética dos produtos da amplificação por PCR dirigida à região de indel do gene *hsp70* a partir do DNA genômico de isolados não caracterizados previamente quanto à espécie filogenética. De um total de dezoito isolados, três foram positivos e observou-se, por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, a amplificação uma banda de 400 pb. Os isolados 2422, 2226 e Pb156 puderam ser caracterizados como *P. lutzii*. Os demais isolados foram considerados como *P. brasiliensis*. O isolado Pb01 foi utilizado como controle positivo (CP) das reações.

4.2. Microsatélites de DNA

Inicialmente foram feitas reações de PCR empregando cinco marcadores microsatélites denominados PBMS1, PBMS2, PBMS3, PBMS4 e PBMS5 com o objetivo de caracterizar a espécie filogenética de quarenta e oito isolados de *Paracoccidioides*, trinta dos quais foram caracterizados previamente como *P. brasiliensis* (S1, PS2 ou PS3) ou *P. lutzii* (TABELA 2). A análise dos resultados de PCR e a caracterização de cada isolado segundo a espécie filogenética S1, PS2 ou PS3 baseou-se nos padrões apresentados na tabela 4, segundo Matute e colaboradores (2006b). É interessante ressaltar que não havia isolados representativos da espécie filogenética Pb01-like (ou *P. lutzii*) entre os caracterizados por estes autores. Assim, para que um determinado isolado fosse caracterizado como S1, o marcador PBMS4 deveria resultar na amplificação de um produto e deveria apresentar ainda um produto resultante de amplificação de pelo menos um dos outros quatro marcadores (PBMS1, PBMS2, PBMS3 ou PBMS5) (TABELA 5). Para que um isolado fosse caracterizado como PS2, somente os marcadores PBMS2 e PBMS3 deveriam ser amplificados. No caso de um isolado pertencer à espécie filogenética PS3, o marcador PBMS1 deveria resultar em amplificação e o mesmo deveria ocorrer a partir da utilização do marcador PBMS2 e/ou PBMS5.

Os resultados das PCRs dos cinco marcadores de microsatélites são apresentados, a seguir nos itens 4.2.1 e 4.2.2, para, respectivamente, o grupo de isolados cuja espécie filogenética havia sido previamente caracterizada por outros autores (TABELA 2) e o grupo de isolados cuja espécie filogenética era desconhecida (TABELA 3).

4.2.1. Amplificação dos cinco marcadores microssatélites nos isolados previamente caracterizados segundo a espécie filogenética

A figura 8 mostra a resolução eletroforética dos produtos resultantes das reações executadas para os cinco marcadores nos isolados de espécie filogenética conhecida. Com os iniciadores PBMS1, todos os isolados amplificaram uma banda de 600 pb e outra de cerca de 1 kb. Para o PBMS2, exceto para os isolados caracterizados como *P. lutzii* (Pb01, Ed01, 1578, 8334, JHS, JMS, MFC, MND, PLROI, ROSC) e o isolado 63265, os demais amplificaram uma única banda esperada de 200 pb. A banda esperada para o marcador PBMS3 é de 388 pb. Todos os isolados, amplificaram uma banda de aproximadamente 300 pb, exceto 4 dos isolados caracterizados como *P. lutzii* (8334, MND, PLROI e ROSC). É interessante observar também que o padrão de amplificação observado para este marcador nos isolados JHS, JJMS, MFC e MND, previamente caracterizados como *P. lutzii*, foi distinto de todos os demais, observando-se a presença de duas bandas com tamanhos entre 400 – 450 pb. Em treze isolados (63265, Pinguim, Peru, Útero, Pb03, 1017, 1925, Pb01, Ed01, 1578, JHS, JMS e MFC) além da banda de 300 pb, foi observada uma de 700 pb. Em todos os trinta isolados observou-se a amplificação de uma banda de aproximadamente 400 pb, conforme o esperado para o marcador PBMS4. Para o PBMS5, exceto nos dez isolados caracterizados como *P. lutzii*, não foi observada banda de 400 pb.

Os resultados para os cinco marcadores de microssatélites, interpretados segundo a tabela 4, são apresentados, a seguir, na tabela 7. Os isolados das duas prováveis espécies do gênero *Paracoccidioides*, *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, puderam ser distinguidos pela ausência de amplificação, em *P. lutzii*, dos marcadores PBMS2 e PBMS5. Por outro lado, observou-se, para todos os isolados de *P. brasiliensis*, a amplificação de bandas com os 5 marcadores, PBMS1, PBMS2, PBMS3, PBMS4 e PBMS5, sendo este resultado incompatível com a distinção entre as espécies filogenéticas S1, PS2 ou PS3 (TABELA 7).

4.2.2. Amplificação dos cinco marcadores microssatélites nos isolados não caracterizados previamente segundo a espécie filogenética

O DNA genômico de dezoito isolados de *Paracoccidioides* não caracterizados previamente segundo a espécie filogenética (TABELA 3) foi utilizado para a amplificação por PCR empregando os cinco pares de iniciadores para microssatélites (TABELA 4). A figura 9 mostra os resultados da amplificação de todos os cinco marcadores de microssatélites para estes dezoito isolados.

Para o marcador PBMS1, cujo resultado esperado seria a observação de uma banda de cerca de 530 pb, observou-se para todos os isolados a amplificação de uma banda de cerca de 600 pb e outra de aproximadamente 1 kb.

O marcador PBMS2, exceto para os isolados 2422 e Pb156, permitiu a amplificação de uma banda com o tamanho esperado de 200 pb. O resultado da amplificação para PBMS3 mostrou uma banda de aproximadamente 400 pb em todos os isolados, exceto em Pb29 e Pb156. Todos os dezoito isolados amplificaram uma banda de aproximadamente 400 pb referente ao marcador PBMS4. Para o marcador PBMS5, com a exceção dos isolados 2226 e Pb156, para todos se observou a amplificação de uma banda de 400 pb.

Os resultados da amplificação dos cinco marcadores de microssatélites a partir do DNA dos dezoito isolados cuja espécie filogenética não havia sido previamente caracterizada, foram analisados de acordo com a tabela 4. A síntese dos padrões de amplificação e a interpretação dos resultados está apresentada na tabela 8. A interpretação dos padrões de amplificação dos cinco marcadores para a caracterização de espécies filogenéticas ao se aplicar os critérios propostos por Matute e colaboradores (2006b) foi inconclusiva para todos os isolados testados (TABELA 8).

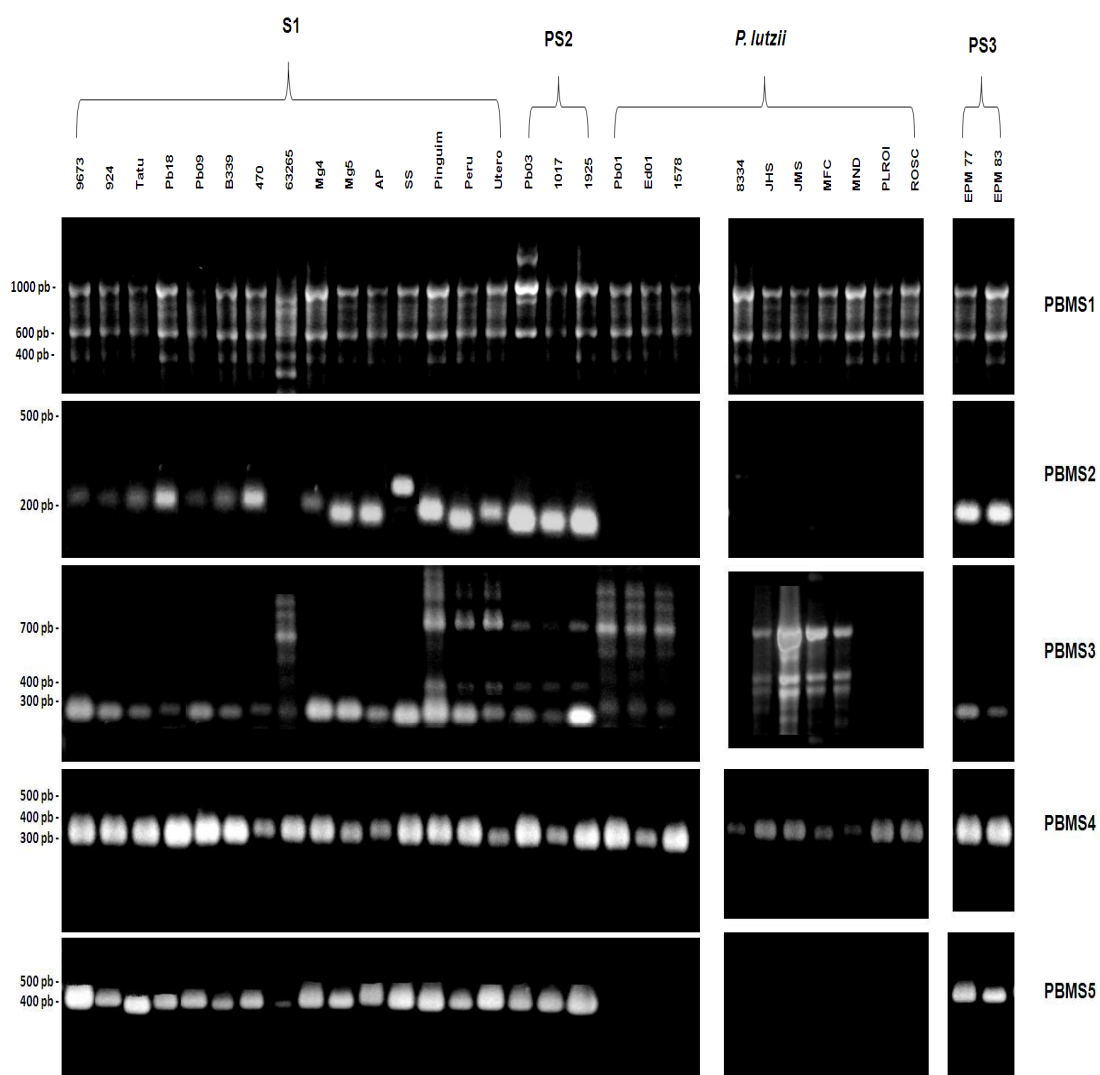


Figura 8. Resolução eletroforética dos produtos da amplificação dos cinco marcadores microssatélites de DNA em trinta isolados de *Paracoccidioides* previamente caracterizados segundo a espécie filogenética. Os iniciadores utilizados e o resultado esperado para cada marcador se encontram listados na tabela 5. A interpretação dos padrões de marcadores na caracterização das espécies filogenéticas se encontra na tabela 7.

Tabela 7. Padrões de amplificação obtidos com cinco marcadores microssatélites em 30 isolados cujas espécies filogenéticas eram conhecidas: concordância com os padrões de amplificação previamente descritos para o gênero *Paracoccidioides*.

Isolados cuja espécie filogenética foi predeterminada *	Padrão de amplificação obtidos no presente trabalho	Padrões descritos por Matute <i>et al.</i> , 2006b	Concordância
<i>P. brasiliensis</i> S1 (15 isolados)	Amplificação dos 5 marcadores: PBMS1, PBMS2, PBMS3, PBMS4 e PBMS5	Amplificação de todos os marcadores.	O padrão de amplificações não permitiu distinguir entre <i>P. brasiliensis</i> S1, PS2 ou PS3.
<i>P. brasiliensis</i> PS2 (3 isolados)	Amplificação dos 5 marcadores: PBMS1, PBMS2, PBMS3, PBMS4 e PBMS5	Amplificação apenas dos marcadores PBMS2 e PBMS3	
<i>P. brasiliensis</i> PS3 (2 isolados)	Amplificação dos 5 marcadores: PBMS1, PBMS2, PBMS3, PBMS4 e PBMS5	Amplificação apenas dos marcadores PBMS1, PBMS2 e PBMS5.	
<i>P. lutzii</i> (10 isolados)	Amplificação de 3 marcadores: PBMS1, PBMS3, e PBMS4., em 7/10 isolados; Ausência de amplificação de PBMS2 e PBMS5 em 10/10 isolados	Isolados de <i>P. lutzii</i> não foram utilizados	<i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i> puderam ser distinguidos pela ausência de amplificação, em <i>P. lutzii</i>, dos marcadores PBMS2 e PBMS5

* ver tabela 2 para informação mais detalhada de cada isolado.

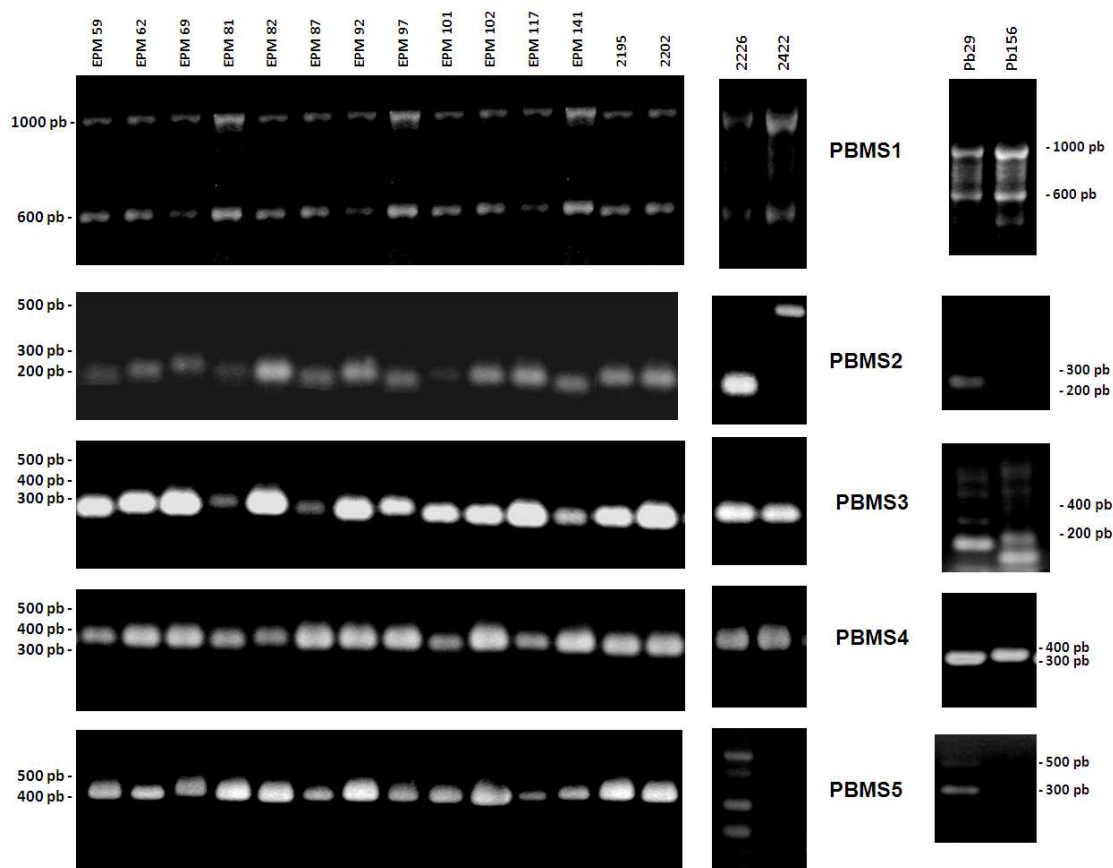


Figura 9. Resultado da amplificação dos cinco marcadores de microssatélites de DNA nos dezoito isolados de *Paracoccidioides* não caracterizados segundo a espécie filogenética. Os iniciadores utilizados e o resultado esperado para cada marcador se encontram listados na tabela 5. A análise dos resultados obtidos neste trabalho se encontra na tabela 8.

Tabela 8. Padrões de amplificação de cinco marcadores microssatélites observados em isolados cujas espécies filogenéticas não haviam sido previamente caracterizadas.

Padrões de amplificação observados no presente trabalho	Número de isolados*/espécie filogenética (Matute <i>et al</i> , 2006b)
Amplificação dos 5 marcadores: PBMS1, PBMS2, PBMS3, PBMS4 e PBMS5	14 <i>P.brasiliensis</i> S1? / PS2? / PS3? Inconclusivo
Amplificação de 4 marcadores com o padrão esperado (PBMS1, PBMS2, PBMS3, e PBMS4); PBMS5: padrão de amplificação atípico	1 <i>P.brasiliensis</i> S1? / PS2? Inconclusivo
Amplificação de 3 marcadores com o padrão esperado (PBMS1, PBMS3, PBMS4); PBMS2: padrão de amplificação atípico PBMS5: ausência de amplificação	1 <i>P.brasiliensis</i> S1? Inconclusivo
Amplificação de 3 marcadores com o padrão esperado (PBMS1, PBMS2, PBMS4); PBMS3 e PBMS5: padrões de amplificação atípicos	1 <i>P.brasiliensis</i> S1? / PS3? Inconclusivo
Amplificação de 2 marcadores com o padrão esperado (PBMS1 e PBMS4); PBMS2 e PBMS5: ausência de amplificação PBMS3: padrão de amplificação atípico	1 <i>P.brasiliensis</i> S1? Pb01-like? Inconclusivo

* ver tabela 3 para informação mais detalhada de cada isolado

4.3. Amplificação de transposons Trem A-H

O DNA genômico de trinta isolados de *Paracoccidioides* cujas espécies filogenéticas já haviam sido caracterizadas foi utilizado para PCR a partir de sete iniciadores destinados às TIR (*Terminal Inverted Repeats*) dos elementos TremA, B, C, D, E, F e H (TABELA 6). Dezoito isolados contidos na tabela 2 haviam sido previamente utilizados por Marini e colaboradores (2010) para verificar a presença desses elementos. Os demais doze isolados, não pesquisados previamente quanto à presença dos elementos Trem, foram testados neste trabalho. Três deles foram previamente caracterizados como da espécie filogenética S1 (9673, 924, Tatu), dois como PS3 (EPM77 e EPM83) e sete como Pb01-like ou *P. lutzii*. Outros dezoito isolados, não caracterizados previamente segundo a espécie filogenética, estão descritos na tabela 3. Os resultados e produtos das PCRs para detecção dos elementos Trem são apresentados abaixo, organizados conforme a existência de informação relativa a sua prévia caracterização, ou não, quanto à espécie filogenética.

4.3.1. Presença dos transposons TremA, B, C, D, E, F e H em isolados previamente caracterizados quanto à espécie filogenética

Os produtos resultantes da amplificação por PCR baseada nas TIR de sete elementos Trem a partir do DNA total de doze isolados de *Paracoccidioides* previamente classificados quanto à espécie filogenética são apresentados na figura 10. Destes, sete são da espécie *P. lutzii* e cinco são da espécie *P. brasiliensis*, três dos quais foram caracterizados como S1 e dois PS3. Os elementos TremA e TremB amplificaram como uma única banda de, respectivamente, 1850 e 1857 pb, nos isolados de *P. brasiliensis*, mas não nos isolados de *P. lutzii*. TremC foi amplificado em todos os isolados das duas espécies. Porém, além da banda esperada de aproximadamente 2 kb, nos isolados de *P. brasiliensis* e no isolado PLROI (*P. lutzii*) foi observada uma banda adicional de 1600 pb. TremD amplificou apenas nos cinco

isolados *P. brasiliensis*, sendo que nos isolados PS3 (EPM77 e EPM83) se observou um padrão distinto, de três bandas, sendo uma delas a banda esperada de 1891 pb. O elemento TremE amplificou apenas nos sete isolados *P. lutzii*. TremF amplificou com o tamanho esperado apenas nos isolados *P. brasiliensis*, observando-se duas bandas nos da espécies filogenética S1 (924, 9673 e Tatu) e uma banda nos isolados PS3 (EPM77 e EPM83), enquanto nos isolados *P. lutzii*, podem ser observadas bandas de tamanhos muito menores do que o esperado, talvez inespecíficas ou correspondendo a elementos muito degenerados. TremH amplificou em todos os isolados utilizados, observando-se, contudo, nos isolados da espécie *P. brasiliensis*, uma banda adicional de aproximadamente 1500 pb.

4.3.2. Amplificação dos elementos TremA, B, C, D, E, F e H em isolados não caracterizados previamente quanto à espécie filogenética

O DNA genômico de dezoito isolados de *Paracoccidioides*, não caracterizados previamente quanto à espécie filogenética, foi utilizado para PCR dirigida às TIR de sete elementos Trem (FIGURA 11). Entretanto, a partir dos resultados obtidos pela PCR destinada ao indel do gene *hsp70* (item 4.2 deste trabalho), três isolados listados na tabela 3 (2422, 2226 e Pb156) serão considerados da espécie *P. lutzii* e os demais da espécie *P. brasiliensis*.

Os elementos TremA e TremB amplificaram uma única banda de, respectivamente, 1850 e 1857 pb, em todos os quinze isolados da espécie *P. brasiliensis*, mas não nos isolados *P. lutzii* (2422, 2226 e Pb156). TremC amplificou em todos os isolados das duas espécies do gênero *Paracoccidioides*. Porém, além da banda esperada de aproximadamente 2 kb, nos isolados de *P. brasiliensis* pode ser observada uma banda adicional de 1600 pb. TremD amplificou apenas nos isolados *P. brasiliensis* e TremE apenas nos três isolados *P. lutzii*. TremF amplificou apenas nos isolados *P. brasiliensis*, com alguns isolados mostrando bandas polimórficas ou inespecíficas. TremH amplificou em todos os dezoito isolados

utilizados. Entretanto, nos isolados da espécie *P. brasiliensis*, pode ser observada uma banda adicional de aproximadamente 1500 pb.

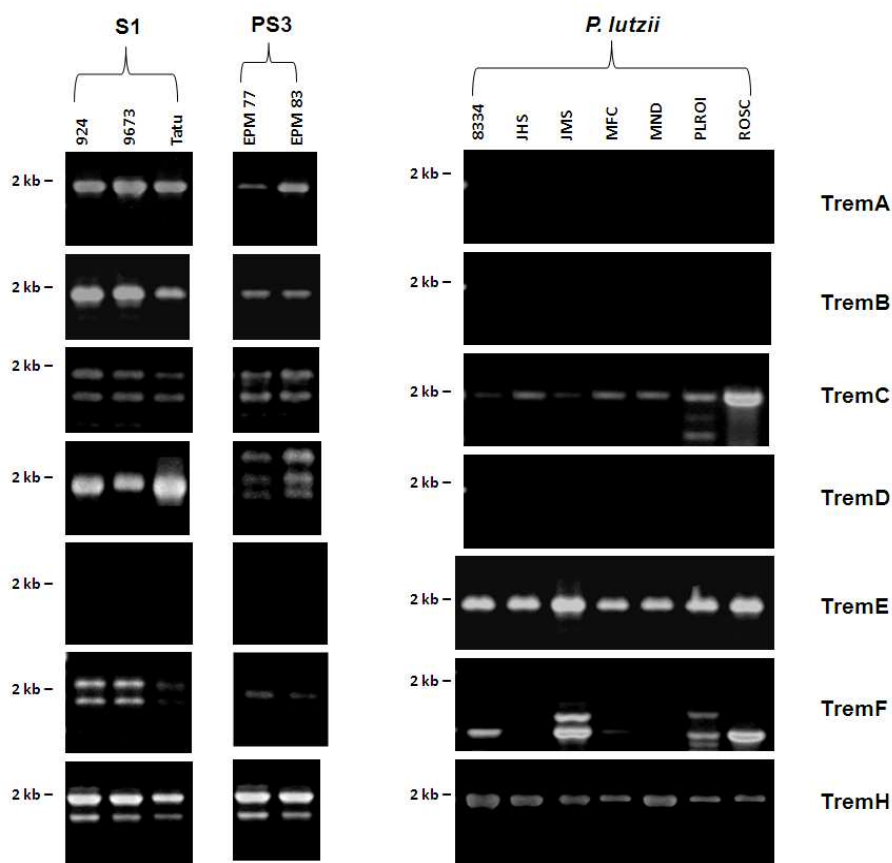


Figura 10. Resolução eletroforética dos produtos da amplificação por PCR de sete elementos Trem em doze isolados de *Paracoccidioides* previamente caracterizados quanto à espécie filogenética. As colunas correspondem à resolução eletroforética em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação por PCR empregando iniciadores específicos para as TIR dos elementos Trem A-F e H (tabela 6), a partir do DNA genômico de isolados de *P. brasiliensis* das espécies filogenética S1 e PS3 e, à direita, de isolados da espécie *P. lutzii*.

4.4. TremG

Apesar da identificação de oito famílias de elementos Trem, Marini e colaboradores (2010) pesquisaram em seu trabalho, a presença de somente sete destes elementos. Neste trabalho, além destes sete elementos, desenharam-se iniciadores para a pesquisa do elemento TremG, com o objetivo de averiguar experimentalmente, pela primeira vez, a sua presença em diversos isolados de *Paracoccidioides* e seu potencial uso como marcador molecular. O produto de amplificação apresentou tamanho compatível com o esperado de 1,3 kb (FIGURA 5). A partir do DNA genômico de quarenta e oito isolados de *Paracoccidioides* (TABELAS 2 e 3) foi feita a PCR destinada à região conservada do TremG. Os resultados mostram que o TremG está presente apenas nos isolados *P. brasiliensis* (FIGURA 12). Entretanto, o isolado 63265, considerado da espécie S1, foi o único isolado da espécie *P. brasiliensis* que não amplificou o elemento TremG.

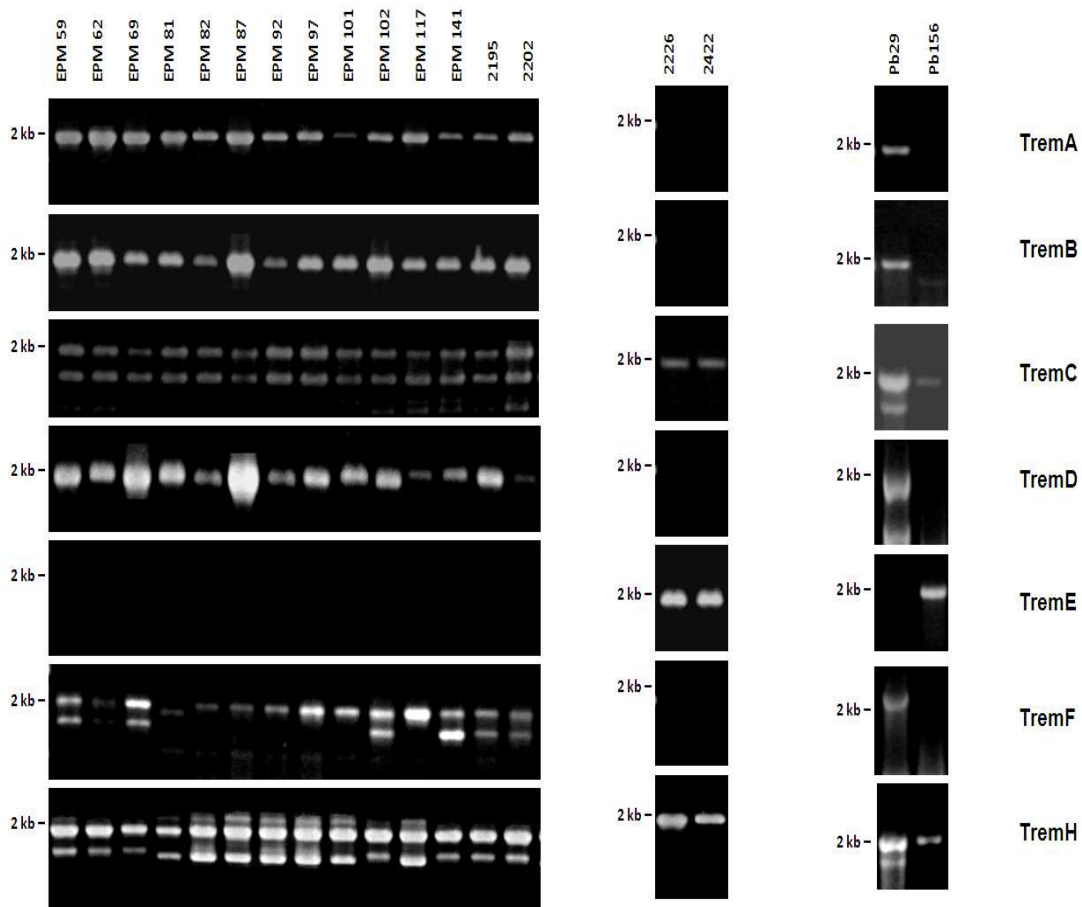


Figura 11. Resolução eletroforética dos produtos da amplificação por PCR de sete elementos Trem em dezoito isolados de *Paracoccidioides* não caracterizados quanto à espécie filogenética. As colunas correspondem à resolução eletroforética em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação por PCR empregando iniciadores específicos para as TIR dos elementos Trem A-F e H (TABELA 6), a partir do DNA genômico de diferentes isolados de *P. brasiliensis* e de *P. lutzii*.

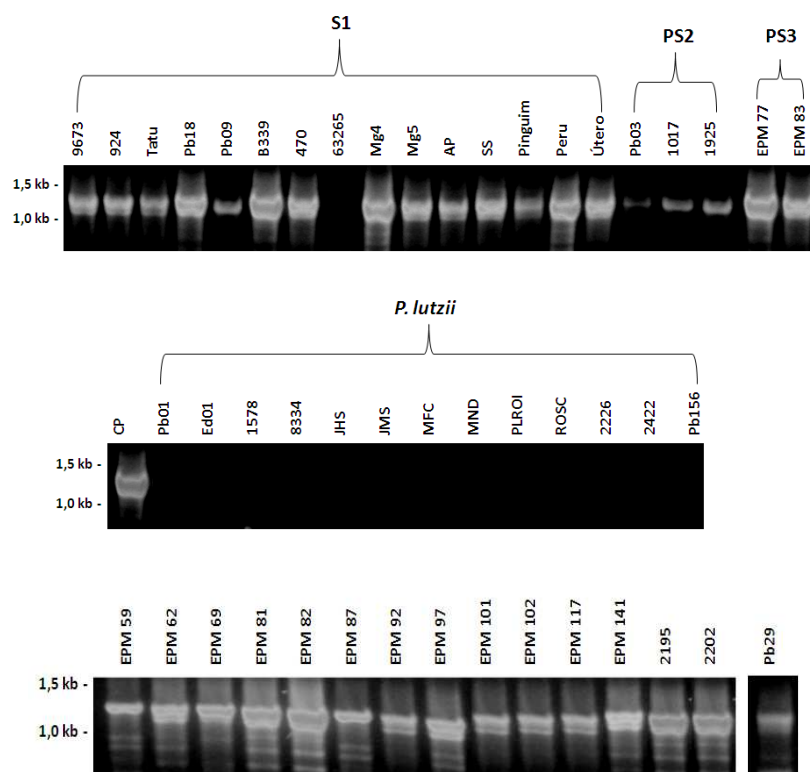


Figura 12. Resolução eletroforética dos produtos da amplificação do elemento TremG em quarenta e oito isolados de *Paracoccidioides*. Apenas os isolados *P. lutzii* e o isolado 63265 (S1 de *P. brasiliensis*) não amplificaram uma banda de 1,3 kb, tamanho esperado para a amplificação do elemento com os iniciadores descritos na metodologia deste trabalho. O isolado Pb18 foi utilizado como controle positivo (CP) das reações.

5. DISCUSSÃO

Definir o conceito de espécie é especialmente difícil em fungos. Os parâmetros utilizados nem sempre são suficientes, uma vez que muitos apresentam morfologia e fisiologia similares e não apresentam reprodução sexuada conhecida (TAYLOR, JACOBSON *et al.*, 1999). Como outros fungos, *Paracoccidioides* não possui um estágio teleomórfico descrito e é refratário a análises citogenéticas clássicas. Entretanto, análises moleculares e filogenéticas tem sido determinantes para sua categorização taxonômica.

A partir de 2006, a PCM passou a ser vista como uma micose sistêmica causada por pelo menos três espécies crípticas (S1, PS2, PS3 do complexo *P. brasiliensis*). Em 2008, uma quarta espécie filogenética, denominada inicialmente como Pb01-*like*, foi proposta por Carrero e colaboradores (2008), com base em análises filogenéticas baseadas em comparações de sequências gênicas de múltiplos *loci* para diversos isolados do fungo oriundos de diferentes origens geográficas. E, no ano de 2009, propôs-se que os isolados caracterizados como Pb01-*like* fossem considerados como uma nova espécie do gênero, a ser denominada *Paracoccidioides lutzii*, por ser significativamente divergente das outras três espécies crípticas então reconhecidas no gênero. Apesar disso, a especiação do gênero *Paracoccidioides* é ainda controversa. Para alguns pesquisadores, parece estar claro que existem quatro espécies, para outros, S1, PS2 e PS3 seriam na verdade variantes geográficas de uma única espécie – *P. brasiliensis*. Assim, para outros autores, como Salgado-Salazar e colaboradores (2010), existiriam apenas duas espécies do fungo, *P. brasiliensis* e *P. lutzii*.

No complexo de espécies de *Paracoccidioides* existem muitos fenótipos variáveis, como características de crescimento, aspecto da colônia miceliana, produção de conídios, transição micélio/levedura, microscopia leveduriforme (brotamentos, forma e tamanho das células), virulência, termotolerância, entre outros (THEODORO *et al.*, 2005). Hahn e colaboradores (2003), por exemplo, empregando a técnica de RAPD, para a tipagem de isolados verificaram que pacientes que adquiriram PCM a partir de isolados pertencentes à atual espécie *P. lutzii* apresentaram melhor resposta terapêutica ao trimetropim-sulfametoxazol se comparados a isolados da atual espécie

P. brasiliensis (S1). Assim, a identificação correta de espécies do gênero *Paracoccidioides* torna-se necessária também para compreensão dos aspectos clínicos da PCM.

Portanto, a definição de espécie, no caso de fungos do gênero *Paracoccidioides* é extremamente importante para o correto diagnóstico e tratamento da PCM. Para isto, podem ser usados marcadores moleculares capazes de distinguir entre as quatro espécies filogenéticas de *Paracoccidioides*. Este trabalho relata a avaliação de três tipos de marcadores moleculares utilizados para discriminar entre as espécies filogenéticas de *Paracoccidioides*: 1) um par de iniciadores destinados à região de indel do gene *hsp70*; 2) marcadores microssatélites de DNA; 3) elementos transponíveis denominados Trem A-H.

Com o objetivo de identificar isolados da espécie *P. lutzii* dentre os diversos isolados (TABELAS 2 e 3), foi utilizado um par de iniciadores destinados a uma região de indel do gene *hsp70*, encontrada exclusivamente no isolado Pb01 e em isolados Pb01-like (CARRERO *et al.*, 2008). O gene *hsp70*, possui dois introns, de 178 e 72 pb (da SILVA *et al.*, 1999) e foi considerado a região mais polimórfica dentre as testadas pela análise *multilocus* no trabalho de Teixeira e colaboradores (2009) utilizando vários isolados de *Paracoccidioides*. Dos quarenta e oito isolados utilizados no presente trabalho, quatorze (FIGURAS 6 e 7) resultaram na amplificação de uma banda de 400 pb, mostrando que estes isolados podem ser classificados como *P. lutzii*. Os dez isolados classificados por diversos autores como *P. lutzii* (TABELA 2), tiveram sua espécie confirmada neste trabalho. Três isolados, Pb156, 2226 e 2422, não caracterizados previamente, foram classificados como *P. lutzii*. Os demais isolados da tabela 3 por não amplificarem a banda de 400 pb, foram considerados da espécie *P. brasiliensis* (podendo ser S1, PS2 ou PS3).

Os isolados Ed01 e 1578, são provenientes de Goiás e foram previamente caracterizados como *P. lutzii* (antigo clado Pb01-like) pela técnica de RAPD no trabalho de MARINI e colaboradores (2010). O isolado 8334 também é proveniente de Goiás e, os isolados JMS, JHS, MFC, MND, 2226 e 2422 são originados do Mato-Grosso. A região centro-oeste do Brasil, mais especificadamente os estados de Mato Grosso e Goiás, são considerados endêmicos para a espécie *P. lutzii* (TEIXEIRA *et al.*, 2009). O

estado de Mato Grosso tem uma alta incidência da PCM, com casos diários, formando uma região geográfica de risco endêmico para aquisição da doença (HANH *et al.*, 2003). É importante ressaltar que três isolados *P. lutzii* (ROSC/PLROI e Pb156) são provenientes dos estados de Roraima e Espírito Santo, regiões não endêmicas desta espécie, e outros dois isolados (2195 e 2202), também provenientes do Mato Grosso, foram, contudo, classificados como *P. brasiliensis*, sugerindo que as espécies *P. brasiliensis* e *P. lutzii* possam não ser restritas à uma única região geográfica.

Dados obtidos por Teixeira e colaboradores (2009) sugerem que a espécie filogenética S1 e a espécie *P. lutzii* sejam simpátricas, uma vez que os isolados Pb13 (ou SS, caracterizado como da espécie S1) e Pb01 (*P. lutzii*) são provenientes da mesma região (Goiás). Hahn e colaboradores (2003) através de resultados de RAPD, mostraram que isolados do Mato Grosso, genotipicamente semelhantes a Pb18 (S1 de *P. brasiliensis*) compartilham a mesma área dos isolados *P. lutzii*. O isolado 63265, proveniente da Argentina, foi previamente descrito como pertencente a espécie filogenética S1 de *P. brasiliensis* (PUCCIA *et al.*, 2008; MARINI *et al.*, 2010) mas, neste trabalho, amplificou uma banda de 400 pb característica de isolados da espécie *P. lutzii*. Marini e colaboradores (2010) utilizando o resultado de RAPD para construção de um dendograma, observaram que o isolado 63265 (Pb12) aparece em um ramo separado, não agrupado com os demais isolados S1. Sendo assim, acredita-se que o isolado 63265 possa ser um híbrido, resultado do cruzamento genético das duas espécies do gênero *Paracoccidioides*. Este não seria o primeiro caso relatado de isolados híbridos do fungo. Resultados obtidos por Teixeira e colaboradores (2009) descrevem dois possíveis híbridos de S1 e PS2 (isolados denominados 769 e 133). Estes isolados híbridos poderiam representar uma nova linhagem evolutiva vinda do cruzamento de duas espécies filogenéticas de *P. brasiliensis*. Espera-se obter mais informações à respeito do isolado 63265, a partir de sequenciamento do produto amplificado pelo par de iniciadores destinados ao indel do gene *hsp70*.

A espécie *P. lutzii* é filogeneticamente distante das três espécies filogenéticas reconhecidas em *P. brasiliensis* e possui genoma de 3Mb, um tamanho maior do que o encontrado para Pb18 (S1) e para Pb03 (PS2). Dados obtidos pelo sequenciamento do isolado Pb01 mostraram que o número de genes preditos para *P. lutzii* é maior do que

para Pb18 (S1) e Pb03 (PS2) e que *P. lutzii* também possui duas vezes mais cópias de elementos genéticos móveis em seu genoma, principalmente retrotransposons, se comparado a *P. brasiliensis* (DESJARDINS *et al.*, 2011). Análises baseadas em sequenciamento de multilocus gênicos revelaram que *P. lutzii* e *P. brasiliensis* estão reprodutivamente isolados e que provavelmente compartilharam um ancestral comum há cerca de 32 milhões de anos (TEIXEIRA *et al.*, 2009).

Se as espécies filogenéticas de *Paracoccidioides* estão separadas geneticamente, podem acumular certas diferenças de sequências que podem resultar em alterações de capacidades ou habilidades como a ocupação de novos nichos ecológicos ou em diferentes estratégias para sobrevivência no hospedeiro ou no ambiente (THEODORO *et al.*, 2008). Entretanto, poucos trabalhos até hoje conseguiram correlacionar as espécies filogenéticas de *Paracoccidioides* com aspectos clínicos da PCM. As comparações em relação à virulência dos diversos isolados do fungo não possuem um caráter conclusivo, visto que existem diferenças experimentais (modelo animal, via de infecção, tamanho de inóculo, tipo de análise) que podem levar a diferentes resultados e conclusões para um mesmo isolado (PUCCIA *et al.*, 2008).

Molinari-Madlum e colaboradores (1999) selecionaram seis isolados representativos de dois grupos principais gerados por RAPD (grupo I e II) para inocular por via intraperitoneal em camundongos B10.A. O grupo I mostrou padrão de infecção regressivo, com poucos danos aos tecidos e disseminação, enquanto o grupo II (isolados Pb01 e 7455) resultou em intensa, progressiva e disseminada peritonite, com extenso dano tecidual no diafragma e em outros órgãos. Entretanto, outros trabalhos não conseguiram correlacionar grupos genéticos gerados por RAPD com virulência ou aspectos clínicos da PCM (CALCAGNO *et al.*, 1998; MOTTA *et al.*, 2002; KUROKAWA *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2010).

Carvalho e colaboradores (2005) também usaram camundongos B10.A com o objetivo de comparar o grau de infecção causado por isolados de *P. brasiliensis* que possuem sequências de *PbGP43* filogeneticamente distantes: grupo PS2 (isolados Pb2, Pb3, Pb4) e grupo S1 (isolados Pb5, Pb8, Pb9, Pb12, Pb18). Os autores compararam a taxa de recuperação fúngica de órgãos por UFC (Unidade Formadora de Colônia) e aspectos histopatológicos dos órgãos acometidos. O grupo formado

pelos isolados PS2 causou um menor número de mortes nos animais infectados e foram recuperados em menor UFC se comparado ao grupo de isolados S1. Além disso, a resposta imunológica nos animais infectados por isolados do grupo PS2 foi predominante do tipo Th1, com altas taxas de IgG2a, IgG2b e IgG3. Os resultados obtidos sugerem que isolados PS2 provocam uma resposta distinta no hospedeiro, sendo que em camundongos B10.A, ocorre a prevenção da progressão da doença. Em contraste, o isolado Bt84 (PS2) foi considerado virulento em um trabalho com camundongos suíços (KUROKAWA *et al.*, 2005) e um outro isolado PS2 de tatu (T101F) foi considerado extremamente agressivo em modelo testicular de hamster (HEBELER-BARBOSA *et al.*, 2003).

Costa e colaboradores (2010) analisaram dez isolados ambientais de *Paracoccidioides* em relação a composição antigênica, sorologia, patogenicidade e aspectos moleculares. Os resultados gerados por RAPD mostram que os isolados possuem alta variabilidade genética, porém, não foi possível correlacionar os três ramos gerados com virulência ou origem geográfica dos isolados. O exoantígeno Gp43 é considerado a base molecular do diagnóstico da PCM, entretanto, análises mostraram que apenas seis dos dez isolados ambientais secretam esta molécula, sendo quatro em grande quantidade e dois em baixa quantidade. Preparações antigênicas preparadas contendo gp43 de quatro isolados foram capazes de detectar anticorpos via teste de imunodifusão, entretanto, dois isolados de tatu (T1 e T2) apesar de secretarem gp43, apresentaram-se negativos neste teste. Quando exoantígenos dos dez isolados foram testados por ELISA, todos, exceto o isolado (262 Uber) foram reconhecidos por anticorpos presentes no soro de pacientes. Além disso, todos os isolados ambientais testados foram considerados não virulentos, devido a sobrevivência de todos os animais infectados.

Um exemplo da importância do reconhecimento de espécies em *Paracoccidioides* é o não reconhecimento de antígenos produzidos em um local por soros de pacientes provenientes de locais diferentes. Em um estudo desenvolvido por Batista Jr e colaboradores (2009), dois isolados de *Paracoccidioides* provenientes de duas áreas geográficas distintas foram comparadas em termos de sensibilidade e especificidade em relação ao diagnóstico da PCM. Exoantígenos do isolado 550B do

Mato-Grosso e do isolado B339 (S1) de São Paulo (usado como referência) foram comparados em testes de imunodifusão com soros de pacientes do Mato-Grosso e de São Paulo. Antígenos e soros provenientes do mesmo estado apresentaram de 90 a 100% de positividade nos testes de imunodifusão, porém, testes cruzados (antígeno de um estado cruzado com soro de pacientes de outro estado), apresentaram de 26 a 42% de positividade. Estes resultados sugerem que as diferenças na composição antigênica estão provavelmente relacionadas às peculiaridades filogenéticas dos isolados da espécie *Paracoccidioides lutzii* provenientes da região centro-oeste. Entretanto, os autores apenas supõem que o isolado 550B seja pertencente a nova espécie descrita, sendo ainda necessários estudos sorológicos mais abrangentes, com isolados devidamente identificados, pertencentes às quatro espécies filogenéticas.

Apesar das diferenças entre as quatro espécies filogenéticas de *Paracoccidioides*, todas são ou foram capazes de induzir doença e, conseqüentemente, esta habilidade não é uma característica exclusiva para identificação de uma determinada espécie. A identificação correta da espécie filogenética de *Paracoccidioides* pode ajudar no conhecimento a respeito dos aspectos clínicos da PCM. Porém, aliado às dificuldades experimentais, existe a dificuldade de uso dos marcadores moleculares já descritos para o fungo, uma vez que dependem, em sua grande maioria, tempo e dinheiro. Desta forma, existe a necessidade de marcadores moleculares precisos, fáceis de utilizar, de baixo custo e capazes de distinguir entre as quatro espécies filogenéticas.

Microsatélites estão entre os tipos de sequências de DNA mais variáveis presentes no genoma (ELLEGREN, H., 2004), constituindo uma fração extensa de DNA não codificante (LI *et al.*, 2002). Microsatélites, ou sequências simples repetidas, são segmentos de DNA repetidos em *tandem* compostos de um a seis pares de bases. Em *P. brasiliensis*, a maioria dos microsatélites está localizado em regiões não codificantes e os mais abundantes são hexanucleotídeos (NASCIMENTO *et al.*, 2004). Os microsatélites tem sido usados na identificação de diversos fungos patogênicos devido às vantagens de serem detectáveis por sequenciamento ou pelo tamanho do produto de PCR e por serem altamente polimórficos e reproduzíveis (NASCIMENTO *et al.*, 2004). Aplicações da análise de polimorfismos de microsatélites em multilocus se

mostraram bem sucedidas quando aplicadas à análises de variabilidade genética em outros fungos como *Coccidioides immitis* (FISHER *et al.*, 2000), *Aspergillus fumigatus* (ROSEHART *et al.*, 2002; VANHEE *et al.*, 2009), *Trichophyton rubrum* (GRASER *et al.*, 2007), *Microsporum canis* (SHARMA *et al.*, 2007), *Penicillium marneffeii* (FISHER *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2011) e *Candida* spp (FOULET *et al.*, 2005; ENACHE-AUGOULVANTE, *et al.*, 2010).

Em *P. brasiliensis*, o uso de microssatélites como marcadores moleculares foi descrito por Matute e colaboradores (2006b). Além do método de PCR, os autores descrevem um sistema para discriminação das três espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* baseado no número de repetições de cada *loci* ou marcador. Entretanto, para este sistema é necessário sequenciar o produto amplificado de cada marcador para cada isolado, o que é extremamente trabalhoso e implica em custo elevado. Portanto, optou-se pelo sistema de PCR baseado em cinco marcadores microssatélites denominados PBMS1, PBMS2, PBMS3, PBMS4 e PBMS5. Segundo Matute e colaboradores (2006b), o sistema de tipagem por PCR se baseia em pares de marcadores que distinguem uma determinada espécie filogenética (TABELA 4). Assim, para que um determinado isolado seja caracterizado como S1, o marcador PBMS4 deve amplificar juntamente com pelo menos um dos outros quatro marcadores (PBMS1, PBMS2, PBMS3 ou PBMS5). Para que um isolado seja PS2, somente os marcadores PBMS2 e PBMS3 devem amplificar. No caso de um isolado pertencer à espécie filogenética PS3, o marcador PBMS1 deve amplificar juntamente com o PBMS2 e/ou PBMS5.

Neste trabalho, foram analisados quarenta e oito isolados de *Paracoccidioides* empregando reações de PCR dirigidas aos cinco marcadores microssatélites propostos. Deste total, trinta isolados haviam sido previamente caracterizados como S1, PS2, PS3 ou *P. lutzii* (TABELA 2). De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, todos os isolados S1, PS2 e PS3 previamente caracterizados, tiveram sua espécie filogenética confirmada pela amplificação de pelo menos um par de marcadores microssatélites que tipifica a espécie filogenética. Entretanto, todos os isolados pertencentes a uma determinada espécie, também puderam ser caracterizados como pertencentes a duas outras espécies filogenéticas do complexo

Paracoccidioides (TABELA 7). Assim, os isolados S1 também seriam caracterizados como PS2 ou PS3. Os isolados PS2 puderam ser caracterizados como PS2, mas também o seriam como S1 ou PS3. Dois isolados previamente descritos como PS3, poderiam ser, neste trabalho, caracterizados como S1, PS2 ou PS3. Os isolados *P. lutzii* (TABELA 2) pela amplificação de marcadores de S1 poderiam ser classificados neste trabalho como *P. brasiliensis* S1. Porém, é importante ressaltar que Matute e colaboradores (2006b) não trabalharam como isolados da espécie *P. lutzii*.

Os isolados da tabela 3, exceto Pb156 e 2422, poderiam ser classificados como pertencentes a qualquer das espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* (S1, PS2 e PS3) (TABELA 8). Portanto, os isolados (exceto Pb156 e 2422) não caracterizados segundo a espécie filogenética (TABELA 3) foram classificados apenas como *P. brasiliensis*, uma vez que não puderam ser discriminados em S1, PS2 ou PS3 por meio do emprego de marcadores microssatélites. O isolado 2422 seria classificado como S1 ou PS3. O isolado Pb156 seria classificado como S1 devido apenas à amplificação do par PBMS1 e PBMS4 (TABELA 7).

Os microssatélites são marcadores genéticos codominantes, com polimorfismo neutro e alta taxa de reprodutibilidade e especificidade (DETTMAN & TAYLOR, 2004). Erros durante a replicação do DNA são considerados os principais mecanismos mutacionais para a formação de polimorfismo de microssatélites pois resultam em variações em seu tamanho. Durante a replicação, a cadeia de DNA que está sendo polimerizada pode se dissociar da fita molde e, devido à natureza repetitiva dos microssatélites, as fitas podem se reanelar erroneamente, fenômeno também conhecido como *strand slippage replication* (NASCIMENTO *et al.*, 2004; GEMAYEL, *et al.*, 2010). Assim, ao final da replicação, a fita de DNA recém polimerizada pode conter um número de repetições diferente da fita molde. Este tipo de mutação pode gerar uma homoplasia de tamanho (DETTMAN & TAYLOR, 2004). Este é um fator complicador, pois altas taxas de mutação nos *loci* microssatélites (10^{-2} a 10^{-5}) resultam em polimorfismo de tamanho dessas regiões, o que pode contrabalancear os efeitos da deriva genética. Assim, alelos que foram perdidos por deriva podem reaparecer na população, resultando em uma homoplasia. Portanto, a existência de alelos que são idênticos em tamanho pode não representar um carácter homólogo (de mesma origem,

em um ancestral comum), mas sim um carácter homoplásico (FISHER *et al.*, 2000). Os cinco marcadores descritos por Matute e colaboradores (2006b) não possuem carácter homoplásico, sendo confirmados como perfeitos microssatélites pelo sequenciamento de seus alelos. Entretanto, segundo os autores, o poder discriminativo de cada *locus* é baixo, e nenhum dos cinco marcadores pode ser usado sozinho para reconhecer isolados entre as espécies. Porém, pares de *loci* parecem efetivos na diferenciação entre as três espécies filogenéticas, principalmente entre isolados S1 e PS2. A baixa diversidade encontrada em isolados PS3 seria responsável pela ausência do poder de discriminação quando os cinco marcadores são usados para o seu reconhecimento (MATUTE *et al.*, 2006b).

No presente trabalho, a amplificação dos marcadores microssatélites gerou bandas de tamanho menor e maior que o descrito na literatura (FIGURAS 8 e 9). O fenómeno do *strand-slippage replication* também ocorre *in vitro*, nas reações de amplificação por PCR. Desta forma, podem ser gerados produtos que diferem em tamanho do principal produto a ser amplificado (ELLEGREN, H., 2004). Porém, para cada marcador, a amplificação foi considerada positiva através da banda gerada na região esperada (TABELA 5) como foi feito no trabalho de Nascimento e colaboradores (2004) que descreveram padrões de microssatélites observados em uma coleção de etiquetas de sequências aleatórias que representam cerca de 20% do genoma do fungo.

O resultado esperado do uso dos marcadores microssatélites era que o par de marcadores específicos para cada espécie filogenética de *P. brasiliensis*, amplificasse apenas nos isolados da espécie filogenética em questão. Assim, nos isolados PS3, apenas os marcadores PBMS1/PBMS2/PBMS5 deveriam amplificar, o que caracterizaria aquele isolado na um membro da espécie filogenética 3 (PS3). Porém, nestes isolados, os marcadores PBMS3 e PBMS4 também amplificaram. Da mesma forma, para isolados anteriormente descritos como S1 ou PS2, também se observou a impossibilidade de uma conclusão quanto á espécie filogenética. Ao contrário dos resultados obtidos por Matute e colaboradores (2006b), este trabalho mostra que o uso dos marcadores microssatélites não pode discriminar cada isolado como pertencente a uma única espécie filogenética.

Sabe-se que análises da distribuição de elementos transponíveis têm sido empregadas na identificação de linhagens e de espécies fúngicas e para o estabelecimento de relações filogenéticas, sendo, portanto, úteis como marcadores moleculares (DABOUSSI *et al.*, 2001; HUA-VAN *et al.*, 2001; MONROY & SHEPPARD, 2005; MA *et al.*, 2010; MARINI *et al.*, 2010). Os elementos transponíveis são abundantes nos fungos e representam de 3 a 20% do genoma em vários fungos filamentosos (DABOUSSI *et al.*, 2003; HUA-VAN *et al.*, 2005). Além disso, tanto os elementos de Classe I (retrotransposons) como os de Classe II (transposons de DNA) podem ser encontrados, representando até 14% do genoma dos Ascomicetos (BIÉMONT & VIEIRA, 2006). A maioria dos transposons de DNA descritos em fungos pertence à superfamília *Tc1/mariner*, que é a mais distribuída na natureza (MISKEY *et al.*, 2005). Estes elementos têm entre 1,3 e 2,4 Kb, com TIR de tamanhos variados, sendo o dinucleotídeo TA seu sítio de inserção. Os elementos transponíveis podem produzir vários efeitos nos genomas, como inativação ou modificação de genes, quebra de cromossomos, recombinações ou rearranjos genômicos que conferem plasticidade (DABOUSSI, 1997).

O conhecimento acerca da presença de elementos transponíveis no genoma de fungos do gênero *Paracoccidioides* é recente. De acordo com Desjardins e colaboradores (2011) os transposons constituem aproximadamente de 8-9% do genoma de Pb03 (PS2) e Pb18 (S1) e 16% do genoma de Pb01 (*P. lutzii*). Além disso, os três genomas de *Paracoccidioides* contém todos os tipos básicos de elementos transponíveis (TABELA 1), sendo que, o repertório de elementos da Classe II em *P. brasiliensis* inclui as famílias *Mariner*, *hAT*, *Fot* e *Ant1*, achados em menor número de cópias em *P. lutzii* (DESJARDINS *et al.*, 2011).

Marini e colaboradores (2010) encontraram e estudaram oito famílias de transposons de DNA pertencentes a superfamília *Tc1/mariner*. Estes elementos foram denominados Trem A-H e possuem um tamanho que varia de 1,8 a 2,4 kb. Foi observado a presença de elementos Trem em isolados filogeneticamente relacionados: TremA, B e F foram encontrados somente em isolados S1 e PS2; TremD foi encontrado em S1 e TremE somente nos isolados da espécie *P. lutzii*. Sendo assim, tornou-se clara a possibilidade dos elementos Trem serem também utilizados como

marcadores moleculares para diferenciar as espécies filogenéticas do gênero *Paracoccidioides*.

Neste trabalho, trinta isolados de *Paracoccidioides* (listados nas TABELAS 2 e 3) foram utilizados para a execução de reações de PCR empregando iniciadores dirigidos às TIR dos elementos TremA, B, C, D, E, F e H. Os isolados descritos na tabela 3 (exceto 2226, 2422 e Pb156) foram previamente classificados como pertencentes à espécie *P. brasiliensis*, através dos resultados das PCRs destinadas ao indel do gene *hsp70* e aos cinco marcadores de microssatélites. Do total de trinta isolados, doze foram previamente descritos na literatura: dois PS3 (EPM 77 e 83), três S1 (924, 9673 e Tatu) e sete da espécie *P. lutzii* (8334, JMS, JHS, MFC, MND, PLROI, ROSC).

TremA e B amplificaram em todos os isolados *P. brasiliensis* classificados previamente pela literatura ou neste trabalho, mostrando uma banda única de 1850 pb e 1857 pb respectivamente (FIGURAS 10 e 11). Estes dois elementos não amplificaram em nenhum dos isolados *P. lutzii*. É interessante ressaltar que a presença de elementos Trem em isolados PS3 não tinha sido estudada anteriormente. Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os de Marini e colaboradores (2010), demonstrando que TremA e B estão presentes apenas em isolados da espécie *P. brasiliensis*. Estes autores sugerem que TremA e TremB podem ser elementos ativos no genoma de *P. brasiliensis*. Quando transpõem, os elementos do tipo transposons de DNA geram quebra da dupla fita de DNA que é reparada pela maquinaria celular (MISKEY *et al.*, 2005). Desta forma, além dos efeitos diretos da transposição como inativação gênica, haverá recombinação promovida pelo reparo da quebra na dupla fita. A transposição destes dois elementos pode ser um fator envolvido na variabilidade genética observada em isolados de *P. brasiliensis* (MARINI *et al.*, 2010).

TremC é considerado o transposon mais abundante no genoma de *Paracoccidioides*, com 165 cópias truncadas dispersas nos genomas dos três isolados (Pb18, Pb03, Pb01) recém sequenciados (MARINI *et al.*, 2010). Os elementos TremC e H amplificaram em todos os trinta isolados utilizados. Porém, para ambos, os isolados de *P. brasiliensis*, (S1, PS2 e PS3) mostram um padrão de amplificação com duas bandas, ao contrário da maioria dos isolados *P. lutzii* que mostra somente uma banda

de 2 kb (FIGURAS 10 e 11), o que sugere a presença de cópias degeneradas destes elementos. Estes resultados corroboram com os encontrados por Marini e colaboradores (2010) que verificaram a presença destes dois elementos em dezoito isolados do fungo. A presença dos elementos TremC e TremH em todos os isolados indica que estes dois elementos provavelmente estavam presentes em um ancestral comum das quatro espécies filogenéticas de *Paracoccidioides*.

TremD amplificou em todos os isolados de *P. brasiliensis*, mostrando uma banda de aproximadamente 2 kb. No trabalho de Marini e colaboradores (2010) TremD esteve presente em todos os isolados S1, e mostra por PCR uma banda fraca no isolado 1017 (PS2) e em análises por *Southern Blot*. Entretanto, os resultados deste trabalho mostram a presença deste elemento também em isolados PS3, onde foi observado um padrão de 3 bandas, sendo esperada uma banda de 1891 pb (FIGURA 10). Portanto, TremD parece estar somente presente em isolados de *P. brasiliensis*, ausentes de *P. lutzii*. De acordo com dados obtidos *in silico*, TremD está presente em apenas 5 cópias, 4 delas com ORFs íntegras, e apenas no isolado Pb18 (S1) (MARINI *et al.*, 2010). Este padrão é compatível com uma inserção recente no genoma, uma vez que o elemento parece não ter sido inativado pelo sistema de defesa do genoma.

TremE amplificou apenas nos isolados *P. lutzii* utilizados neste trabalho. Segundo Marini e colaboradores (2010) o elemento TremE está presente apenas no genoma de Pb01 (*P. lutzii*). Assim, levando em consideração também os resultados da amplificação pelos iniciadores descritos por Teixeira e colaboradores (2009), os isolados 2226, 2422 e Pb156, não caracterizados previamente pela literatura, são da espécie *P. lutzii*. É importante ressaltar que a ausência de TremE também nos dois isolados PS3 utilizados corrobora para a presença deste elemento somente na espécie *P. lutzii*.

TremF é o elemento mais longo, com 2329 pb e o terceiro mais abundante no genoma de *P. brasiliensis*, e parece não estar presente em isolados *P. lutzii* (MARINI *et al.*, 2010). Neste trabalho, todos os isolados *P. brasiliensis* (S1, PS2 e PS3) amplificaram uma banda de 2,3 kb e em dez isolados pode ser observada uma banda adicional de 2 kb, o que sugere a presença de cópias degeneradas do elemento. Além disso, em quatro isolados *P. lutzii* (8334, JMS, PLROI e ROSC) foram observadas

bandas inespecíficas resultantes da amplificação com os iniciadores destinados às TIR de TremF, o que pode indicar a presença de cópias degeneradas do elemento também nestes isolados. Assim como TremA, B e D, o TremF parece estar presente somente em isolados da espécie *P. brasiliensis*, uma vez que amplifica apenas nos isolados S1, PS2 e PS3. Como o TremE foi somente encontrado em isolados *P. lutzii* e os elementos TremA, B, D, F se mostram exclusivos de isolados *P. brasiliensis*, sugere-se que estes cinco elementos podem ter sido adquiridos horizontalmente após a separação das duas espécies do gênero *Paracoccidioides*.

Os elementos Trem representam uma significativa proporção do genoma – cerca de 1% de *P. brasiliensis* (S1 e PS2) e 0,6% de *P. lutzii* – indicando o sucesso de sua proliferação (MARINI *et al.*, 2010). Quando transposons de DNA se movem ao longo do genoma, pegadas ou TSDs podem ser formados flanqueando o elemento. A maioria das superfamílias de transposons de DNA possuem um TSD característico com um tamanho e sequência específicos (WICKER *et al.*, 2007). No trabalho de Marini e colaboradores (2010) os TSDs foram encontrados em seis das oito famílias Trem: em TremH, as cópias truncadas e provavelmente inativadas, podem ter resultado em perda ou alteração da TSD, dificultando sua identificação; em TremG, não foi possível determinar as suas TIRs e, conseqüentemente, suas TSDs flanqueadoras.

As cópias do elemento TremG encontradas em *P. brasiliensis* possuem tamanho e sequência de nucleotídeos bastante variáveis. Entretanto, a porção central do elemento é bastante conservada (FIGURA 5), estando presente o domínio catalítico DDE, cuja similaridade permitiu sua classificação como um elemento da superfamília *Tc1/mariner* (MARINI *et al.*, 2010). Além dos outros sete elementos Trem, o elemento TremG foi utilizado neste trabalho com o objetivo de analisar sua presença em diversos isolados de *Paracoccidioides*. Os resultados mostram um produto de amplificação de tamanho compatível com o esperado de 1,3 kb (FIGURA 12). TremG, assim como TremA, B, D e F, parece estar presente apenas em isolados da espécie *P. brasiliensis* como observado por Marini e colaboradores (2010). De acordo com análises *in silico* feita por estes autores, TremG possui apenas cópias truncadas, sendo seis em Pb03 (PS2) e onze em Pb18 (S1), estando ausente em Pb01 (*P. lutzii*). Entretanto, o isolado 63265, considerado da espécie S1, foi o único isolado da espécie *P. brasiliensis* que

não amplificou o elemento TremG. É interessante ressaltar que o resultado da PCR destinada ao indel de *hsp70* (FIGURA 6) sugere que este isolado seja um híbrido das espécies *P. lutzii* e *P. brasiliensis*.

Este trabalho dedicou-se à verificar a presença dos elementos Trem em um maior número de isolados ambientais e clínicos. Foram usados quatro isolados de tatus (Tatu, EPM 101, 102 e 117) e os outros vinte e seis isolados clínicos. Por apresentar temperatura corporal e imunidade relativamente baixas, o tatu parece favorecer o desenvolvimento de certas doenças infecciosas, podendo ter desempenhado um importante papel na evolução de *Paracoccidioides* à condição zoofílica (BAGAGLI *et al.*, 1998), o que explicaria uma maior tendência para o estabelecimento de lesões crônicas nos hospedeiros, a baixa produção de conídios em saprobiose e seu difícil isolamento ambiental (FRANCO *et al.*, 2000). Os quatro isolados de tatus utilizados neste trabalho foram classificados como *P. brasiliensis* e os resultados gerados pelos três tipos de marcadores moleculares não diferem dos resultados obtidos a partir de isolados clínicos. Análises comparativas da região ITS e do gene codificador de *GP43* confirmam a similaridade entre os isolados clínicos e de tatus (HEBELER-BARBOSA *et al.*, 2003), indicando que tanto o homem quanto os tatus estão se infectando pelos mesmos “ecopatogenotipos” (BAGAGLI *et al.*, 1998; FRANCO *et al.*, 2000). Além disso, existe um relato de infecção simultânea de um paciente com dois isolados de *Paracoccidioides* geneticamente distintos (BATISTA JR *et al.*, 2010).

Dados epidemiológicos indicam que a PCM possui uma ampla distribuição geográfica na América Central e Sul, ocorrendo principalmente na Colômbia, Venezuela e Brasil (RESTREPO, 1985; BRUMMER *et al.*, 1993). O Brasil responde por 80% dos casos relatados e os maiores índices de mortalidade podem ser encontrados na região Sudeste e Sul (PRADO *et al.*, 2009). De um total de quarenta e oito isolados, de diferentes regiões geográficas utilizados neste trabalho, trinta e três são provenientes do Brasil, pertencentes às cinco regiões do país: treze da região centro-oeste; doze da sudeste; quatro da sul; três da norte e um da nordeste (TABELAS 2 e 3). Os outros quatorze isolados são originados de países Sul-Americanos, sendo cinco isolados da Venezuela; quatro da Colômbia; três da Argentina e um do Uruguai. Somente o isolado EPM 117 não possui uma origem conhecida.

Matute e colaboradores (2006a) analisaram 65 isolados do fungo, representativos de seis áreas endêmicas de PCM. Através da análise por concordância genealógica de cinco genes, foi possível detectar três espécies crípticas: S1 (38 isolados), encontrada no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela; PS2 (6 isolados), encontrada no Brasil e Venezuela e PS3 (21 isolados), encontrada apenas na Colômbia (FIGURA 2). Dados obtidos por estes autores demonstram que S1 e PS2 são simpátricas e, portanto, a divergência genética entre as duas sugere a existência de uma barreira não geográfica ao fluxo gênico. Além disso, considerando que PS3 é restrito geograficamente à Colômbia, os autores atribuíram a especiação do grupo PS3 a um possível evento de migração seguido de isolamento geográfico de isolados S1 para a Colômbia. No presente trabalho, quatro isolados são provenientes da Colômbia, sendo dois (EPM 77 e 83) classificados como PS3 por Theodoro e colaboradores (2008). Os outros dois isolados não puderam ser confirmados como da espécie PS3 através do uso dos três tipos de marcadores moleculares, apesar de serem provenientes da região geográfica que abriga especificamente esta espécie filogenética.

Apesar de terem sido descritos padrões específicos para amplificação por PCR para a caracterização de isolados como pertencentes às espécies filogenéticas S1, PS2 e PS3, os cinco marcadores microssatélites utilizados neste trabalho não conseguiram discriminar os isolados quanto à filiação específica a uma determinada espécie filogenética. Por outro lado, é importante ressaltar que o TremD parece produzir um padrão de três bandas em isolados PS3, o que não acontece nas outras duas espécies de *P. brasiliensis* (FIGURA 10). Sendo assim, torna-se necessário verificar se este padrão se mantém em outros isolados PS3. Em caso afirmativo, o elemento TremD pode ser um bom candidato para distinguir isolados PS3, por amplificar um padrão característico de três bandas. Além disso, os resultados obtidos por Marini e colaboradores (2010) apontam que TremD amplifica quase que somente nos isolados S1. Desta forma, os isolados da tabela 3, exceto 2226, 2422 e Pb156 (considerados *P. lutzii*) poderiam ser classificados como *P. brasiliensis* da espécie S1. A espécie S1 parece estar mais amplamente distribuída geograficamente, enquanto a espécie PS2 parece se distribuir preferencialmente na região sudeste/sul do Brasil,

ocorrendo de forma bem menos frequente que S1, tanto em hospedeiros humanos quanto em tatus (MATUTE *et al.*, 2006a). A menor frequência de isolamento de *P. brasiliensis* PS2 pode estar relacionada à capacidade de produção de conídios infectantes. Terçarioli e colaboradores (2007) observaram que dois isolados PS2 (Bt84 e T10) não foram capazes de produzir conídios em meio ágar extrato de solo, enquanto os demais isolados parecem ter uma produção exuberante neste meio.

Pelos resultados obtidos neste trabalho e pelo estudo de Marini e colaboradores (2010), os elementos TremA, B, D, F e G parecem ser bons candidatos à marcadores da espécie *P. brasiliensis*, uma vez que não amplificam em isolados *P. lutzii*. O TremE pode ser considerado, juntamente com os iniciadores do indel de *hsp70*, marcadores moleculares específicos para a espécie *P. lutzii*. TremC e H parecem estar presentes em todos os isolados de ambas as espécies do fungo, mas existe um diferencial no padrão de bandas amplificadas, sendo duas bandas características de isolados *P. brasiliensis* e uma característica de *P. lutzii*. Tal padrão de bandas poderia ser usado a fim de diferenciar as duas espécies do gênero *Paracoccidioides*. Desta forma, os elementos Trem se mostraram bons candidatos para serem utilizados como marcadores moleculares para distinguir, pelo menos, entre as duas espécies do gênero *Paracoccidioides*.

6. CONCLUSÕES

- O par de iniciadores destinados ao indel do gene *hsp70* é útil para diferenciar entre as duas espécies do gênero *Paracoccidioides* (*P. brasiliensis* e *P.lutzii*).
- O isolado 63265 (caracterizado como *P. brasiliensis* espécie filogenética S1) parece ser um híbrido resultante do cruzamento de duas espécies de *Paracoccidioides* (*P. brasiliensis* e *P.lutzii*).
- O sistema dos cinco marcadores microssatélites permitiu distinguir entre as espécies *P. lutzii* e *P. brasiliensis*, porém, não permitiu distinguir entre as três espécies crípticas de *P. brasiliensis* (S1, PS2 e PS3).
- Os elementos TremA-H mostraram-se marcadores moleculares precisos e fáceis de utilizar para discriminar entre as espécies do gênero *Paracoccidioides* (*P. brasiliensis* e *P. lutzii*): os elementos TremA, B, C, D, F e G estão presentes apenas em *P. brasiliensis*, enquanto TremE está presente apenas em *P. lutzii*.
- Isolados da espécie filogenética PS3, não analisados previamente por meio de amplificação de elementos Trem, mostraram a presença no genoma dos elementos TremA, B, C, D, F, G e H, num padrão *P. brasiliensis*.
- Como marcadores moleculares, os elementos Trem não parecem capazes de discriminar isolados quanto à sua origem ambiental ou clínica.
- Por meio do emprego de marcadores moleculares distintos, como a região do indel do gene *hsp70* e o elemento Trem E, isolados do fungo oriundos de outras regiões do Brasil, além da região centro-oeste, foram caracterizados como da espécie *P. lutzii*.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abadio, A.K.; Kioshima, E.S. *et al.* **Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens.** BMC Genomics, n. 12. 2011.

Almeida, A. J., D. R. Matute, *et al.* **Genome size and ploidy of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals a haploid DNA content: flow cytometry and GP43 sequence analysis.** Fungal Genet Biol, n.44, v.1, p.25-31. 2007.

Araújo, R. A. D. C. **Elementos genéticos móveis no transcriptoma do fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis*: caracterização de dois retrotransposons majoritários.** (Doutorado). Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

Aristizabal, B. H., K. V. Clemons, *et al.* **Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females.** Infect Immun, n.66, v.11, p.5587-5591. 1998.

Bagagli, E.; Franco, M. *et al.* **High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus noveminctus*): an ecological study.** Med. Mycol. n. 41, p. 217-223. 2003.

Bagagli, E., A. Sano, *et al.* **Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis.** Am J Trop Med Hyg, n.58, v.4, p.505-512. 1998.

Batista Jr., J., Camargo, Z.P., Fernandes, *et al.* **Is geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis?** Mycosis n.53, p.176-180. 2009.

Biémont, C.; C. Vieira. **Genetics: junk DNA as an evolutionary force.** Nature, n.443, p.521-524. 2006.

Boekhout, T., M. Renting, *et al.* **The use of karyotyping in the systematics of yeasts.** Antonie Van Leeuwenhoek, n.63, v.2, p.157-163. 1993.

Brillet, B., Y. Bigot, *et al.* **Assembly of the Tc1 and mariner transposition initiation complexes depends on the origins of their transposase DNA binding domains.** Genetica, n.130, v.2, p.105-120. 2007.

Brummer, E., E. Castaneda, *et al.* **Paracoccidioidomycosis: an update.** Clin Microbiol Rev, n.6, v.2, p.89-117. 1993.

Calcagno, A.M.; Niño-Vega, G.; San-Blas, F. **Geographic discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) Analysis.** J.Clin. Microb., n.36, v.6, p. 1733-1736, 1998.

Cano, M. I., P. S. Cisalpino, *et al.* **Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*.** J Clin Microbiol, n.36, v.3, p.742-7. 1998.

Carrero, L. L., G. Nino-Vega, *et al.* **New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen.** Fungal Genet Biol, n.45, v.5, p.605-612. 2008.

Carvalho, K.C., Ganiko, L., *et al.* **Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype.** Microbes and Infection, n.7, p. 55-65. 2005.

Chiocchetti, A.; Bernardo, I.; *et al.* **Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in Carnation Tissue by PCR Amplification of Transposon Insertions.** The American Phytopathological Society, n. 89, v. 12, p. 1169-1174. 1999.

Costa, P.F., Fernandes, G.F., *et al.* **Characteristics of environmental *Paracoccidioides brasiliensis* isolates.** Mycopathologia, n.169, p.37-46, 2010.

Daboussi, M.J. **Fungal transposable elements and genome evolution.** Genetica, n. 100, p. 253-260. 1997.

Daboussi, M.J.; Devière, J.M.; *et al.* **Evolution of the *Fot1* Transposons in the Genus *Fusarium*: Discontinuous Distribution and Epigenetic Inactivation.** Mol. Biol. Evol, n. 19, v. 4, p. 510-520. 2001.

Daboussi, M. J. e P. Capy. **Transposable elements in filamentous fungi.** Annu Rev Microbiol, n.57, p.275-99. 2003.

da Silva, S.P., Borges-Walmsley, M.I., *et al.* **Differential expression of an hsp70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*.** Mol Microbiol, n.31, v.4, p.1039-1050, 1999.

Davière JM, Langin T, Daboussi MJ, 2001. **Potential role of transposable elements in the rapid reorganization of the *Fusarium oxysporum* genome.** Fungal Genet. Biol. n.34, p. 177-192.

Desjardins, C.A., Champion, M.D., *et al.* **Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis.** PLOS Genetics, n. 7, 2011.

Dettman, J.R., Taylor, J.W. **Mutation and evolution of microsatellite loci in *Neurospora***. *Genetics*, n.168, p. 1231-1248. 2004.

Ellegren, H. **Microsatellites: simple sequences with complex evolution**. *Nature reviews. Genetics*. n.6, p. 435-445. 2004.

Enache-Augoulvante, A.; Bourget, M. *et al.* **Multilocus Microsatellite Markers for Molecular Typing of *Candida glabrata*: Application to Analysis of Genetic Relationships between Bloodstream and Digestive System Isolates**. *Journal of Clin Microb*, n.11, v.48, p.4028-4034.2010.

Feitosa L. dos, S., P. S. Cisalpino, *et al.* **Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis***. *Fungal Genet Biol*, n.39, v.1, p.60-69. 2003.

Felipe, M. S., R. V. Andrade, *et al.* **Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis**. *Yeast*, n.20, v.3, p.263-271. 2003.

Felipe, M.S., Andrade, R.V., *et al.* **Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells**. *The Journal of Biol Chem*, n. 26, p. 24706-24714, 2005.

Ferreira, M. S., L. H. Freitas, *et al.* **Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dogfood probably contaminated with soil in Uberlandia, Brazil**. *J Med Vet Mycol*, n.28, v.3, p.253-6. 1990.

Feschotte, C. e E. J. Pritham. **DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes**. *Annu Rev Genet*, n.41, p.331-68. 2007.

Fisher, M.C.; Hoog, S.; Akom, N.V. **A highly discriminatory multilocus microsatellite typing (MLMT) system for *Penicillium marneffeii***. *Mol Ecol Notes*. n.4, v.3, p.515-518.2004.

Fisher, M.C., Koenig, G., *et al.* **A test for concordance between the multilocus genealogies of genes and microsatellites in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis***. *Mol bio and evol*, n. 17, v.8, p. 1164-1174. 2000.

Fontana, F. F.; dos Santos C. T. B, *et al.* **Seropidemiological Survey of Paracoccidioidomycosis Infection Among Urban and Rural Dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil**. *Mycopathologia*, n.169, p. 159-165. 2010.

Foulet, F., Nicolas, N., *et al.* **Microsatellite marker analysis as a typing system for *Candida glabrata***. *J Clin Microb*, n.43, v.9, p. 4574-4579, 2005.

Franco, M., E. Bagagli, *et al.* **A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil**. *Med Mycol*, n.38, v.3, p.185-91. 2000.

Franco, M., M. R. Montenegro, *et al.* **Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms.** Rev Soc Bras Med Trop, n.20, v.2, p.129-32. 1987.

Futuyama, D.J. **Biologia Evolutiva.** 2 ed. Ribeirão Preto. Funpec, 2002, 117p.

Gemayel, R., Vincens, M.D., Legendre, M., Verstrepen, K.J. **Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences.** Annual review of genetics, n. 44, p. 445-447, 2010.

Gezuele, E. Aislamiento de *Paracoccidioides sp.* de heces de pinguino de la Antártida,. **IV Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomycosis.** Caracas, Venezuela, 1989.

Girardin, H. e J.P, Latgé. DNA extraction and quantitation. **In: B. Maresca e G. S. Kobayashi (Ed). Molecular Biology of Pathogenic fungi.** A laboratory Manual. New York: Telos Press, 1994. DNA extraction and quantitation. p. 5-9.

Goldman, G. H., E. Dos Reis Marques, *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.** Eukaryot Cell, n.2, v.1, p.34-48. 2003.

Gonzalez, J. F., Montiel, N.A., Maass, R.L. **First report on the diagnosis and treatment of encephalic and urinary paracoccidioidomycosis in a cat.** Journal of feline medicine and surgery, n. 12, v.8., p. 659-662, 2010.

Graser, Y.; Frohlich, J. *et al.* **Microsatellite markers reveal geographic population differentiation in *Trichophyton rubrum*.** J of Medical Microbiology, n. 56, p.1058-1065. 2007.

Groose, E.; Tamsitt, J. R. ***Paracoccidioides brasiliensis* recovered from intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia.** Sabouraudia, n.4, p.124-125,1965.

Guerra, A.C.P. **Caracterização molecular de isolados clínicos e ambientais do fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis* por RAPD e PFGE.** (Mestrado) Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

Hahn, R.C.; Macedo, A.M., *et al.* **Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* atypical isolates by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) Analysis.** Rev. Iberoam. Micol., n. 19, p. 49-51, 2003.

Hebeler-Barbosa, F., Morais, F.V., *et al.* **Comparison of the sequences of the internal transcribed spacer regions and PbGP43 genes of *Paracoccidioides***

***brasiliensis* from patients and armadillos (*Dasypus novemcinctus*).** J Clin Microb, n.41, p. 5735-5737, 2003.

Hua-Van, A.; Langin, T.; Daboussi, M.J. **Evolutionary History of the *impala* Transposon in *Fusarium oxysporum*.** Mol. Biol. Evol. n. 18, v. 10, p. 1959-1969. 2001.

Kapitonov, V. V.; J. Jurka. **Self-synthesizing DNA transposons in eukaryotes.** Proc Natl Acad Sci U S A, n.103, v.12, p.4540-4545. 2006.

Kurokawa, C.S.; Lopes, C.R., *et al.* **Virulence profile of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates.** Association with morphologic and genetic patterns. Rev. Inst. Trop. S. Paulo, n. 47, v. 5, p. 257-262, 2005.

Lacaz C.S. ***Paracoccidioides brasiliensis*: morphology; evolutionary cycle; maintenance during saprophytic life; biology, virulence, taxonomy.** In: Paracoccidioidomycosis. In: F. M. L. C. S. R.-M. A. D. N. G. (Ed.). Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRP Press, 1994. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology; evolutionary cycle; maintenance during saprophytic life; biology, virulence, taxonomy. In: Paracoccidioidomycosis.

Leclerc, M. C., H. Philippe, *et al.* **Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons.** J Med Vet Mycol, n.32, v.5, p.331-341. 1994.

Li, L.; Hu, F. *et al.* **Microsatellite analysis of clinical isolates of the opportunistic fungal pathogen *Penicillium marneffe* from AIDS patients in China.** Scan J Infect Disease, n.8, v.43, p. 616-624. 2011.

Li, Y.C., Korol, A.B., *et al.* **Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review.** Mol ecol, n.11, v.12, p. 2453-2465, 2002.

Ma, L.J.; van der Does, C., *et al.* **Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*.** Nature articles, v. 464, n.18, p. 367-373. 2010.

Marini, M.M.; Zanforlin, T. *et al.* **Identification and characterization of Tc1/mariner-like DNA transposons in genomes of the pathogenic fungi of the *Paracoccidioides brasiliensis*.** BMC genomics, n.11, 2010.

Matute, D. R., J. G. Mcewen, *et al.* **Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies.** Mol Biol Evol, n.23, v.1, p.65-73. 2006a.

Matute, D.R.; Sepulveda, V.E., *et al.* **Microsatellite Analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*.** J.Clin.Microb. n. 44, v.6, p. 2153-2157, 2006b.

Miskey, C., Z. Izsvak, *et al.* **DNA transposons in vertebrate functional genomics.** Cell Mol Life Sci, n.62, v.6, p.629-641. 2005.

Mollinari-Madlun, F.E.W.I.; Felipe, M.S.S.; Soares, C.M.A. **Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by randomly amplified polymorphic DNA analysis.** Med. Mycol. n. 37, p. 269-276, 1999.

Monroy, F.; Sheppard, D.C. **Taf1: A class II transposon of *Aspergillus fumigatus*.** Fungal genetics and biology, n.42, p. 638-645. 2005.

Montenegro, M. R., M. Miyaji, *et al.* **Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, state of Sao Paulo, Brazil, an endemic area of paracoccidioidomycosis.** Mem Inst Oswaldo Cruz, n.91, v.6, p.665-670. 1996.

Montoya, A. E., M. N. Moreno, *et al.* **Electrophoretic karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*.** Fungal Genet Biol, n.21, v.2, p.223-227. 1997.

Montoya, A.E., Alvarez, A.L., *et al.* **Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*.** Medical mycology, n.37, v.3, p. 219-222, 1999.

Morais, F.V., Barros, T.F., *et al.* **Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*.** J Clin Microb, n. 38, v.11, p. 3960-3969, 2000.

Motta, T.R.; Moreira-filho, C.A., *et al.* **Evaluation of DNA polymorphisms amplified by RAPD as genetically associated elements to differentiate virulent and non virulent *Paracoccidioides brasiliensis* isolates.** FEMS Imm. Med. Microb, v.33, p. 151-157, 2002.

Nascimento, E., R. Martinez, *et al.* **Detection and selection of microsatellites in the genome of *Paracoccidioides brasiliensis* as molecular markers for clinical and epidemiological studies.** J Clin Microbiol, n.42, v.11, p.5007-5014. 2004.

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

Oliveira, G.G., Silveira, L.H., *et al.* **Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul States, Brazil.** Mycopathologia, n.17, v.3, p.197-202. 2010.

Oliveira, G.G., Navarro, I.T., *et al.* **Serological survey of Paracoccidioidomycosis in sheep.** n.173, p. 63-68. 2012.

Plasterk, R. H., Z. Izsvak, *et al.* **Resident aliens: the Tc1/mariner superfamily of transposable elements.** Trends Genet, n.15, v.8, p.326-332. 1999.

Prado, M., Silva, M.B., *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.** Mem Inst Oswaldo Cruz, n.104, v. 3, p. 513-521. 2009.

Puccia, R. McEwen J.G., Cisalpino, P.S. **Diversity in *Paracoccidioides brasiliensis*. The PbGP43 gene as a genetic marker.** Mycopathologia, n. 165, v. 5, p. 275-287. 2008.

Rebollo, R.; Horard, B., *et al.* **Jumping genes and epigenetics: towards new species.** Gene, n. 454, p. 1-7. 2010.

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

Restrepo, A.; Benard, G, *et al.* **Pulmonary paracoccidioidomycosis.** Semin Respir Crit Care Med. n. 29, v.2, p. 182-197. 2008.

Restrepo, A., M. E. Salazar, *et al.* **Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis.** Infect Immun, n.46, v.2, p.346-353. 1984.

Ricci, G., F. T. Mota, *et al.* **Canine paracoccidioidomycosis.** Med Mycol, n.42, v.4, p.379-383. 2004.

Richini-Pereira, V. B. Bosco, S. M. G. *et al.* **Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed animals.** Med Mycol, n.46, v.1., p.35-40. 2008.

Richini-Pereira, V. B. Bosco, S. M. G. *et al.* **Importance of xenarthrans in the eco-epidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis*.** BMC Research Notes, n. 2, 2009.

Rosehart, K., Richards, M.H., Bidochka, M.J. **Microsatellite analysis of environmental and clinical isolates of the opportunist fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*.** J Med Microb, n.51, v.12, p.1128-1132. 2002.

Salgado-Salazar, C.; Jones, L.R.; *et al.* **The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers.** Cladistics, n.26, p.1-12, 2010.

San-Blas, F. e G. San-Blas. Protoplast production from the yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: **B. Maresca e G. S. Kobayashi (Ed.). Molecular Biology of Pathogenic fungi.** A Laboratory Manual. New York: Telos Press. Protoplast production from the yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, p.469 – 478,1994.

San-Blas, G. e G. Nino-Vega. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In: **R. L. Cihlar e R. A. Calderone (Ed.). Fungal pathogenesis: principles**

and clinical applications. New York: Marcel Dekker, 2001. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response., p.205

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

Silva-Vergara, M. L., R. Martinez, *et al.* **Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasybus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil.** Med Mycol, n.38, v.3, p.193-199. 2000.

Silva-Vergara, M. L., R. Martinez, *et al.* **Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil.** Med Mycol, n.36, v.1, p.37-42. 1998.

Sharma, R.; Hoog, S. *et al.* **A virulent genotype of *Microsporium canis* is responsible for the majority of human infections.** J of Med Microb, n.56, p. 1377-1385. 2007.

Shikanai-Yasuda, M.A.; Filho, F.Q.T., *et al.* **Consenso em paracoccidioidomicose.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, n. 39, v. 3, p. 297-310. 2006.

Soares, C. M., E. E. Madlun, *et al.* **Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis.** J Clin Microbiol, n.33, v.2, p.505-507. 1995.

Taylor, J., Jacobson, D., Fisher, M. **The evolution of asexual fungi: Reproduction, Speciation and Classification.** Annual Review of Phytopathology, n. 37, p. 197-246, 1999.

Taylor, J.W., Jacobson, D.J., *et al.* **Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi.** Fungal Genet Biol. n.31, v.1, p. 21-32. 2000.

Teixeira, M. M.; Theodoro, R.C., *et al.* **Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus.** Molecular Phylogenetics and Evolution, n. 52, p. 273-283. 2009.

Terçarioli, G.R., Bagagli, E., *et al.* **Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection.** BMC Microbiology, n.7, 2007.

Theodoro, R.C., Candeias, J.M., *et al.* **Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil.** Medical mycology, n.43, v.8, p.725-729, 2005.

Theodoro, R.C., Bagagli, E., Oliveira, C. **Phylogenetic analysis of PRP8 intein in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex.** Fungal genetics and biology, n. 45, v.9, p. 1284-1291, 2008.

Theodoro, R.C.; Volkmann, G. *et al.* **PRP8 intein in Ajellomycetaceae family pathogens: sequence analysis, splicing evaluation and homing endonuclease activity.** Fungal genetics and biology, n.48, v.2, p.80-91. 2011.

Toledo, M. S., S. B. Levery, *et al.* **Characterization of sphingolipids from mycopathogens: factors correlating with expression of 2-hydroxy fatty acyl (E)-Delta 3-unsaturation in cerebrosides of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Aspergillus fumigatus*.** Biochemistry, n.38, v.22, p.7294-7306. 1999.

Trejo-Chávez, A., Ramírez-Romero, R., *et al.* **Disseminated paracoccidioidomycosis in a Southern two-toed sloth (*Choloepus didactylus*).** Journal of comparative pathology, n. 144, p. 231-234, 2011.

Unteireiner, W.A, Scott, J.A., Naveau, F.A., *et al.* **The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associate Onygenales.** Mycol., n.96, v.4, p.812-821, 2004.

Vanhee, L.M. ; Symoens, F. *et al.* **Comparison of multiple typing methods for *Aspergillus fumigatus*.** Clin Microbiol Infect. n. 15, v.7, p.643-650. 2009.

Wicker, T., F. Sabot, *et al.* **A unified classification system for eukaryotic transposable elements.** Nat Rev Genet, n.8, v.12, p.973-982. 2007.