

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Genética

Influência do gene *pacC* na regulação de manosiltransferases no dermatófito *Trichophyton rubrum* em função de variações nutricionais e pH ambiente

Niege Silva Mendes

Ribeirão Preto – SP

2011

Niege Silva Mendes

Influência do gene *pacC* na regulação de manosiltransferases no dermatófito *Trichophyton rubrum* em função de variações nutricionais e pH ambiente

Dissertação apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Antonio Rossi Filho

Ribeirão Preto – SP

2011

Ficha Catalográfica

Mendes, Nieve Silva

Influência do gene *pacC* na regulação de manosiltransferases no dermatófito *Trichophyton rubrum* em função de variações nutricionais e pH ambiente

Ribeirão Preto, 2011.

78 p.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Antonio Rossi Filho

pH extracelular, glicosilação, *Trichophyton rubrum*

Dedico

Ao Gustavo pelo amor, carinho e enorme paciência. Palavras não expressam o que você representa para mim.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio incondicional em todos os momentos e pelo amor sem medidas e sem restrições.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Rossi Filho, pela oportunidade de desenvolver este projeto, me receber sempre com portas abertas para conversas e discussões, compreensão nos momentos difíceis, paciência com meus erros e por ser um orientador tão presente. Aprendi muito com você!

A Profa. Dra. Nilce Maria Martinez Rossi, pela permissão total do uso da estrutura de seu laboratório e pelas valiosas contribuições neste projeto.

Aos amigos e companheiros de laboratório Aline, Rodrigo Santos e Glauce pela contribuição fundamental para que este trabalho fosse desenvolvido, paciência com a minha teimosia, sempre estarem dispostos a me ajudar e me apoiarem nos momentos mais difíceis, por compartilharem momentos felizes e boas risadas... Enfim por fazerem parte não só deste trabalho, mas também da minha vida.

À amiga Nalu pela contribuição do começo ao fim deste trabalho, sempre disponível a me ajudar... Por me ajudar nos meus primeiros passos deste trabalho, pelas horas de descontração, por me apoiar... muito obrigada por tudo.

Aos companheiros do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos: Nalu, Elza, Gabriela, Larissa, Maíra, Tiago, Ana Carolina, Pablo pela convivência e amizade.

À querida Silvinha, por ser essa “mãezona” sempre apoiando nas horas difíceis, pelas risadas e por cuidar tão bem do nosso ambiente de trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos Roseli, Mendel, Marcos pelo apoio e preparo nos materiais, pela amizade, pelo convívio e pela amizade.

Aos técnicos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos José e Beto pela ajuda nos experimentos.

Aos colegas e amigos que já passaram pelo laboratório: Juliana, Janaína, Emiliana, Diana, Vívian, Ernna, Rodrigo, Henrique e Jenny pelo convívio e colaboração com o ambiente de trabalho.

Aos docentes, pós-graduandos e funcionários dos departamentos de Genética e bioquímica da FMRP-USP, pela convivência e amizade.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e contribuições que serão feitas a este trabalho.

As secretárias do departamento de genética Susie, Maria Aparecida, Ana Claudia e Silvia pela atenção, sempre estarem dispostas a ajudar, carinho e amizade dispensados.

Aos meus pais pelo apoio (emocional e financeiro) amor sem limites, tudo o que sou devo a vocês.... Não tenho palavras para agradecê-los e dizer o quanto amo vocês!

A minha querida irmã Naná e meu irmão Marcelo, pela amizade, amor e confiança.... Amo vocês!

A minha avó Lúcia por ser este exemplo de mulher, pelo carinho... e por me dar colo quando preciso.

Ao meu amado noivo Gustavo, por tanta paciência, por me ouvir, por me fazer sorrir... enfim por dividir sua vida comigo! Você é muito importante para mim.

À FAPESP, CNPq, CAPES, FAEPA e Pró-Reitoria de Pós-graduação pelos auxílios recebidos.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!

Resumo

A regulação da expressão gênica é essencial para os fungos se adaptarem às adversidades ambientais, como alterações no pH extracelular, escassez de nutrientes, força iônica e oscilações de temperatura. A resposta adaptativa ao pH ambiente é bem caracterizada em fungos modelo como *Aspergillus nidulans*, e envolve a via de transdução de sinal constituída pelos produtos dos genes *pal* e *pacC*. No dermatófito *Trichophyton rubrum*, o gene *pacC* foi inativado, e a linhagem mutante apresentou uma diminuição na atividade das queratinases, indicando que, de alguma forma, este gene está envolvido na regulação da atividade queratinolítica deste dermatófito, e conseqüentemente na sua virulência e patogenicidade. Além disto, a glicosilação protéica é uma importante forma de regulação pós traducional, estruturando e estabilizando glicoproteínas que podem ser da via secretória, da parede ou da membrana celular. O processo de glicosilação protéica sofre influência do pH extracelular e da fonte nutricional. Foi ainda relatado que este tipo de regulação pós traducional também sofre influência dos genes *palB* e *pacC*, indicando que estes genes tenham um papel na glicosilação de enzimas secretadas. O objetivo deste trabalho foi analisar a influência do pH e da fonte nutricional na expressão de genes que codificam enzimas de *N*- e *O*-manosilação, e sua possível modulação pela proteína PacC no dermatófito *T. rubrum*. Para tanto, foi analisado, por PCR em tempo real, o perfil transcricional destes genes nas linhagens H6 (controle) e *pacC-1*, utilizando-se como fonte de carbono glicose, glicose e glicina ou queratina em vários tempos de cultivo, em pH 5,0 ou 8,0. A análise da expressão gênica revelou que quando a linhagem controle é cultivada em queratina em pH 5,0 ocorre um aumento da expressão da *O*-manosiltransferase, comparado com o cultivo em glicina com glicose e glicose. Porém, nestas mesmas condições o gene da *N*-manosiltransferase da linhagem mutante apresenta maiores níveis de expressão que os da linhagem controle. Em pH 8,0 pode-se notar grande semelhança entre os perfis de expressão apresentados por estes dois genes. Os resultados obtidos indicam que o gene *pacC* tem um papel importante no sensoriamento de nutrientes em meio ácido, modulando a expressão destas transferases, nas condições avaliadas. Estas enzimas podem ativar proteínas que atuam na hidrólise da queratina, ou mesmo formar glicoproteínas de parede celular que são essenciais na adesão do fungo à célula do hospedeiro, sugerindo um papel das manosiltransferases no processo infeccioso.

Abstract

Gene expression regulation is essential for fungi to adapt to environmental adversities, such as changes in the extracellular pH, nutrient starvation, ionic strength, and temperature. The adaptive response to ambient pH is well characterized in model fungi such as *Aspergillus nidulans*, and involves the signal transduction pathway consisting of the products of the *pal* and *pacC* genes. In the dermatophyte *Trichophyton rubrum*, the *pacC* gene was inactivated and the mutant strain showed a decreased activity of keratinases, indicating that, somehow, this gene is involved in the regulation of the keratolytic activity of this dermatophyte, and consequently in its virulence and pathogenicity. Moreover, protein glycosylation is an important form of post-translational regulation, playing a role in protein folding and stability of glycoproteins of the secretory pathway, cell wall or membrane. The process of protein glycosylation is influenced by extracellular pH and nutritional source. It has also been reported that this type of post-translational regulation is also influenced by the *palB* and *pacC* genes, indicating that these genes have a role in glycosylation of secreted enzymes. The objective of this study was to analyze the influence of the pH and nutritional source in the expression of the genes coding for the *N*- and *O*-mannosylation enzymes, and their possible modulation by PacC in the dermatophyte *T. rubrum*. To this end, the transcriptional profile of these genes was analyzed, by Real Time PCR, in the H6 (control) and *pacC-1* strains, using glucose, glucose with glycine, or keratin as the carbon source, in several culture times, at pH 5.0 or 8.0. Gene expression analysis showed that when the control strain is grown in keratin at pH 5.0 there is an increased expression of the *O*-mannosyltransferase encoding gene, compared to the cultivation in glucose and glucose with glycine. However, at the same conditions the gene coding for the *N*-mannosyltransferase presented higher levels of expression in the mutant strain in relation to the control strain. At pH 8.0 there is a great similarity between the expression profile of these two genes. The obtained results indicate that *pacC* gene plays an important role in nutrient sensing at acidic pH by modulating the expression of these transferases in the conditions evaluated. These enzymes can activate proteins that play roles in the hydrolysis of keratin, or even forming cell wall glycoproteins that are essential for the adhesion of the fungus to the host cell, suggesting a role of the mannosyltransferases in the infectious process.

Índice de figuras

Figura 1- Aspectos macro e microscópicos de <i>T. rubrum</i>	15
Figura 2- Regulação da expressão de proteínas pelo pH alcalino	17
Figura 3- Modelo de regulação das enzimas proteolítica pelo pH ambiente.....	21
Figura 4- Principais vias de N-glicosilação em mamíferos e leveduras.....	23
Figura 5- Processo de O-Glicosilação em diferentes espécies de fungos.....	25
Figura 6- Expressão gênica da <i>O</i> -man na linhagem H6 (<i>pacC</i> ⁺) em pH 5,0	57
Figura 7- Expressão gênica da <i>O</i> -man na linhagem <i>pacC-1</i> (<i>pacC</i> ⁻) em pH 5,0.....	57
Figura 8: Expressão gênica da <i>N</i> -man na linhagem H6 (<i>pacC</i> ⁺) em pH 5,0.....	58
Figura 9: Expressão gênica da <i>N</i> -man na linhagem <i>pacC-1</i> (<i>pacC</i> ⁻) em pH 5,0	58
Figura 10: Expressão gênica da <i>O</i> -man na linhagem H6 (<i>pacC</i> ⁺) em pH 8,0.....	59
Figura 11: Expressão gênica da <i>O</i> -man na linhagem <i>pacC-1</i> (<i>pacC</i> ⁻) em pH 8,0.....	59
Figura 12: Expressão gênica da <i>N</i> -man na linhagem H6 (<i>pacC</i> ⁺) em pH 8,0.....	60
Figura 13: Expressão gênica da <i>N</i> -man na linhagem <i>pacC-1</i> (<i>pacC</i> ⁻) em pH 8,0.....	60

Índice das tabelas

Tabela 1- Valores de pH aferido para o meio de cultivo da linhagem H6 de *T. rubrum* após desrepressão em meio mínimo contendo várias fontes de carbono em pH inicial 5,0 53

Tabela 2- Valores de pH aferido para o meio de cultivo da linhagem *pacC-1* de *T. rubrum* após desrepressão em meio mínimo contendo várias fontes de carbono em pH inicial 5,0..... 54

Tabela 3- Valores de pH aferido para o meio de cultivo da linhagem H6 de *T. rubrum* após desrepressão em meio mínimo contendo várias fontes de carbono em pH inicial 8,0 55

Tabela 4- Valores de pH aferido para o meio de cultivo da linhagem *pacC-1* de *T. rubrum* após desrepressão em meio mínimo contendo várias fontes de carbono em pH inicial 8,0..... 55

Índice de quadros

Quadro 1- Sequência do gene da α -actina.....	43
Quadro 2- Sequência do gene da β -tubulina	44
Quadro 3- Sequência do gene da <i>N</i> -man	45
Quadro 4- Sequência do gene da <i>O</i> -man	46
Quadro 5- Alinhamento do gene da α -actina	50
Quadro 6- Alinhamento do gene da β -tubulina.....	51
Quadro 7- Alinhamento do gene da <i>N</i> -man.....	52
Quadro 8- Alinhamento do gene da <i>O</i> -man.....	52

Sumário

I	INTRODUÇÃO.....	14
1	Dermatófitos e <i>Trichophyton rubrum</i>	14
2	Relação patógeno-hospedeiro	15
3	Regulação da expressão gênica pelo pH ambiente	16
4	Glicosilação proteica.....	22
II	OBJETIVOS	28
1	Objetivos gerais	28
2	Objetivos específicos	28
III	JUSTIFICATIVA	30
IV	MATERIAL E MÉTODOS	32
1	Delineamento experimental	32
	1.1 Delineamento dos experimentos de expressão gênica.....	32
	1.2 Delineamento dos experimentos dos produtos amplificados de cada gene.....	33
2	Linhagens utilizadas	34
3	Condições de cultivo.....	34
	3.1 Cultivo em meio sólido MEA (Meio ágar Extrato de Malte)	34
	3.2 Cultivo em meio sabouraud líquido.....	34
4	Meios de cultura e soluções	35
	4.1 Meio MEA.....	35
	4.2 Meio sabouraud	35
	4.3 Meio Mínimo.....	36
	4.3.1 Meio Mínimo contendo glicose.....	37
	4.3.2 Meio Mínimo contendo glicose e glicina	37
	4.3.3 Meio Mínimo contendo queratina	37
5	Sequenciamento de DNA.....	38
	5.1 Extração de DNA.....	38
	5.2 Obtenção do produto de PCR	39
	5.3 Sequenciamento direto do produto de PCR.....	40
	5.4 Análise das sequências.....	40

6	Extração de RNA	41
	6.1 Obtenção do micélio para extração de RNA total	41
	6.2 Tratamento da água com DEPC	41
	6.3 Extração de RNA total.....	41
	6.4 Eletroforese de RNA	42
7	PCR em tempo real	43
	7.1 Construção dos primers	43
	7.1.1 Construção dos primers para o gene da a-actina	43
	7.1.2 Construção dos primers para o gene da b-tubulina.....	44
	7.1.3 Construção dos primers para o gene da <i>N</i> -manosiltransferase	44
	7.1.4 Construção dos primers para o gene da <i>O</i> -manosiltransferase.....	45
	7.2 Síntese de Cdna	46
	7.3 Curvas de dissociação e eficiência dos oligonucleotídeos	47
	7.4 Normalização e cálculo da expressão gênica	47
	7.5 Análise estatística dos dados de PCR em tempo real	48
V	RESULTADOS	50
1	Sequenciamento da região de amplificação e respectivos primers utilizados nos experimentos de PCR em tempo real	50
	1.1 Sequenciamento do gene da a-actina.....	50
	1.2 Sequenciamento do gene da b-tubulina	51
	1.3 Sequenciamento do gene da <i>N</i> -manosiltransferase	51
	1.4 Sequenciamento do gene da <i>O</i> -manosiltransferase	52
2	Valores do pH final de cada cultivo.....	53
3	Expressão dos genes de <i>N</i> – man e <i>O</i> – man de <i>T. rubrum</i> em resposta a diferentes fontes nutricionais e modulação do pH extracelular (ou <i>shift</i> de pH)	56
VI	DISCUSSÃO	62
1	Modulação do pH extracelular em função da fonte nutricional.....	62
2	Expressão dos genes <i>N</i> – man e <i>O</i> – man de <i>T.rubrum</i> em resposta a diferentes fontes nutricionais e pH extracelular	63
VII	CONCLUSÃO	68
VIII	PERSPECTIVAS	70
IX	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

Introdução

I INTRODUÇÃO

1 Dermatofitoses e *Trichophyton rubrum*

Os dermatófitos são fungos filamentosos que afetam tecidos queratinizados, degradando queratina para captação de nutrientes necessários para seu desenvolvimento. São organismos que causam micoses superficiais, denominadas dermatofitoses, as quais são geralmente cutâneas e restritas a pelos, unhas e ao estrato córneo da pele e seus anexos. Porém, em indivíduos imunodeprimidos podem causar abscessos. São fungos que apresentam caráter cosmopolita. Entretanto, a distribuição geográfica das várias espécies em diferentes regiões do mundo varia de acordo com as condições climáticas, sociais e individuais como idade, condições de higiene, imunodeficiência e fatores genéticos (Kern e Blevins, 2004; Seebacher *et al.*, 2008).

De acordo com a morfologia e formação de conídios, os dermatófitos podem ser classificados em três gêneros distintos: *Microsporum*, *Epidermophyton* e *Trichophyton*. Além disso, podem ser divididos em conformidade com seu habitat primário, sendo que espécies geofílicas habitam o solo, zoofílicas os animais e as antropofílicas os seres humanos (Weitzman e Summerbell, 1995; Koneman e Dowell, 2001; Seebacher *et al.*, 2008).

As dermatofitoses, também chamadas de *tinea*, têm como agente etiológico mais comum o *Trichophyton rubrum*, sendo isolado principalmente dos pés (*tinea pedis*), das unhas (*tinea unguinum*), das virilhas (*tinea cruris*) e do corpo (*tinea corporis*). Nos últimos anos, observa-se um aumento no número de infecções causadas por este fungo, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Weitzman e Summerbell, 1995; Ellis *et al.*, 2000).

T. rubrum tem como características morfológicas colônias de crescimento lento, cor branca, aspecto algodinoso ou cotonoso (Figura 1 A), com o reverso da colônia vermelho escuro (Figura 1 B). Microscopicamente apresenta hifas multiseptadas e poucos macroconídios de parede lisa. Os microconídios são numerosos, de formato arredondado semelhante à lágrima, são distribuídos isoladamente ao longo das hifas (Figura 1 C) (Weitzman e Summerbell, 1995; Koneman e Dowell, 2001).

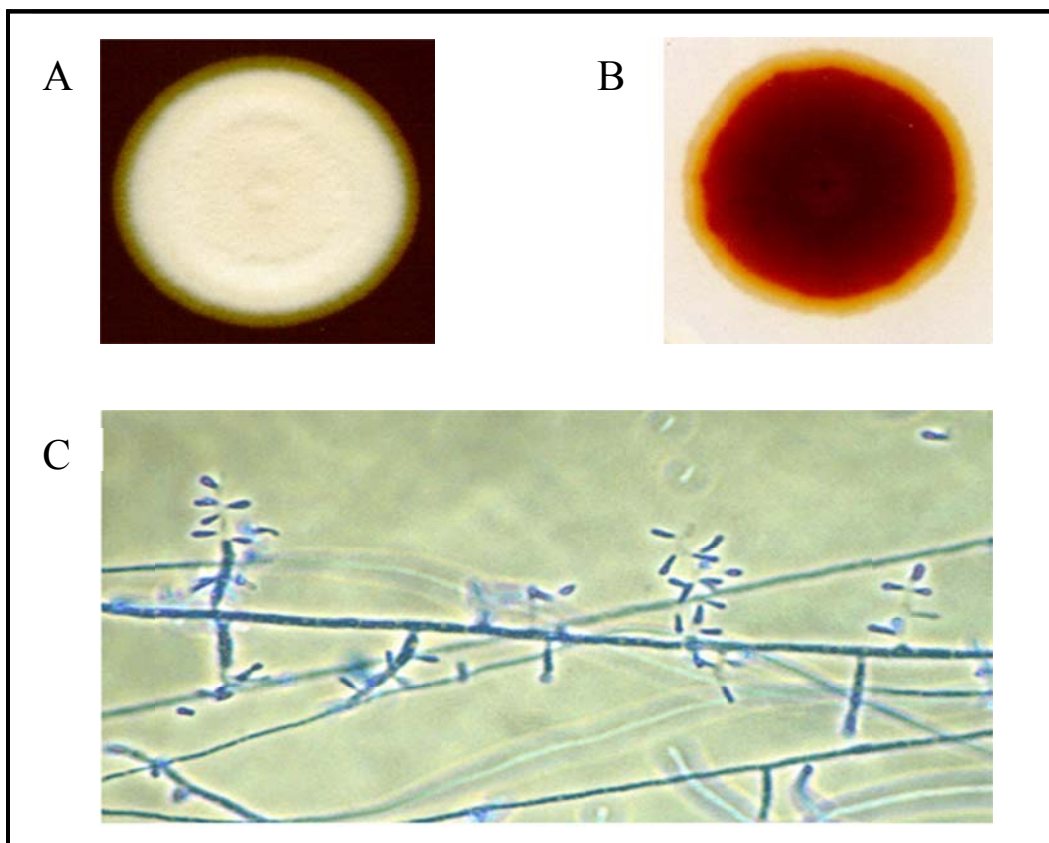


Figura 1: Aspectos macro e microscópicos de *T. rubrum*. A- Frente da colônia de *T. rubrum* em meio Agar Sabouraud. B- Reverso da colônia. C- Microscopia óptica destacando-se os microconídios.

Fonte: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/dermatophytes/>

2 Relação patógeno-hospedeiro

Durante o processo infeccioso, os dermatófitos se deparam com os mecanismos primários de defesa do hospedeiro, como a pele e sua microbiota normal, exposição à luz ultravioleta, falta de umidade, pH ácido e alta temperatura. Uma das mais importantes barreiras contra infecções é a queratinização dos tecidos superficiais, que consiste no processo de renovação do estrato córneo da pele, realizado pelos queratinócitos, levando a descamação epitelial. Para evitar a eliminação juntamente com a descamação do epitélio, o fungo deve se aderir à superfície do tecido. Para tanto, *T. rubrum* expressa glicoproteínas de parede celular contendo mananas que funcionam como adesinas, reconhecendo e se ligando aos resíduos de manose e galactose presentes na superfície da célula do hospedeiro (Esquenazi *et al.*, 2004; Kaufman *et al.*, 2007; Vermout *et al.*, 2008).

O micro-organismo, já aderido à célula, necessita de nutrientes para seu desenvolvimento e manutenção. Para isso, o fungo utiliza macromoléculas presentes no tecido do hospedeiro para sua sobrevivência. Entretanto, devido à seletividade da membrana plasmática, é necessário que ocorra a degradação destes compostos em moléculas menores, para que possam ser transportadas até o interior das células e então metabolizadas. A degradação destes compostos é realizada por enzimas hidrolíticas secretadas que apresentam especificidade para diferentes substratos. Esta maquinaria enzimática é um dos fatores de virulência mais bem caracterizados nos dermatófitos, permitindo a hidrólise de componentes estruturais da pele e possibilitando a invasão tecidual (Kaufman *et al.*, 2007; Vermout *et al.*, 2008).

Uma vez estabelecidos, os dermatófitos desenvolvem uma resposta adaptativa regulada pelo pH ambiente, bem conhecida em fungos modelo. Esta é baseada na expressão de proteínas estruturais e de parede celular, como as queratinases, lipases, nucleases, fosfatases, fosfolipases, com a finalidade de captação de nutrientes e desenvolvimento do organismo (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2003; Peres *et al.*, 2010).

3 Regulação da expressão gênica pelo pH ambiente

Devido ao número crescente de casos de dermatofitoses em pacientes imunocomprometidos nos últimos anos, o estudo da adaptabilidade fúngica a variações ambientais tem sido de fundamental importância na compreensão dos mecanismos de patogenicidade e resistência aos inibidores em organismos patogênicos. Fungos modelo, como *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa* estão sendo utilizados no estudo da resposta adaptativa a mudanças ambientais, como limitação de fosfato inorgânico e variações de pH extracelular (Nahas *et al.*, 1982; Caddick *et al.*, 1986; Peleg e Metzenberg, 1994; Wu *et al.*, 2004).

A investigação sistemática da regulação da expressão gênica em resposta ao pH ambiente no organismo *A. nidulans*, foi feito inicialmente por meio de análises genéticas. Neste trabalho foi observado que, em concentrações limitantes de fosfato e em pH 6,5, os mutantes *pal* (*A*, *B*, *C*, *F*) apresentam altos níveis de fosfatase ácida e baixos níveis de fosfatase alcalina, enquanto que os mutantes *pacC* apresentam aumento dos níveis de fosfatase alcalina e redução de fosfatase ácida (Dorn, 1965). A resposta adaptativa ao pH foi descrita pela primeira vez por Nahas *et al.*, (1982), quando foi demonstrado que, no fungo *N.*

crassa, a secreção, mas não a síntese, das fosfatases é pH dependente. O envolvimento dos genes *pal/pacC* no sensoriamento do pH ambiente foi descrito por Caddick *et al.*, (1986) no fungo *A. nidulans*, demonstrando que a resposta ao pH é mediada por uma via de sinalização constituída por pelo menos sete genes: os genes *pal* (*palA, B, C, F, H e I*) e o gene *pacC*.

O gene *pacC* codifica um fator de transcrição de 678 aminoácidos (72KDa), contendo três dedos de zinco (*zinc-finger*) *Cis₂His₂*, o qual reconhece a região consenso 5'-GCCAR(A/G)G-3' na região promotora de genes responsivos ao pH. Foi proposto um modelo de regulação pelo pH ambiente em *A. nidulans*, no qual o fator de transcrição PacC seria responsável pela ativação da transcrição de genes alcalino-específicos e repressão da transcrição de genes ácido-específicos, modulado por um sinal gerado pelos produtos dos genes *pal* (*A, B, C, F, H e I*) em resposta ao pH alcalino, em meios complexos (Tilburn *et al.*, 1995; Freitas *et al.*, 2011) (Figura 2).

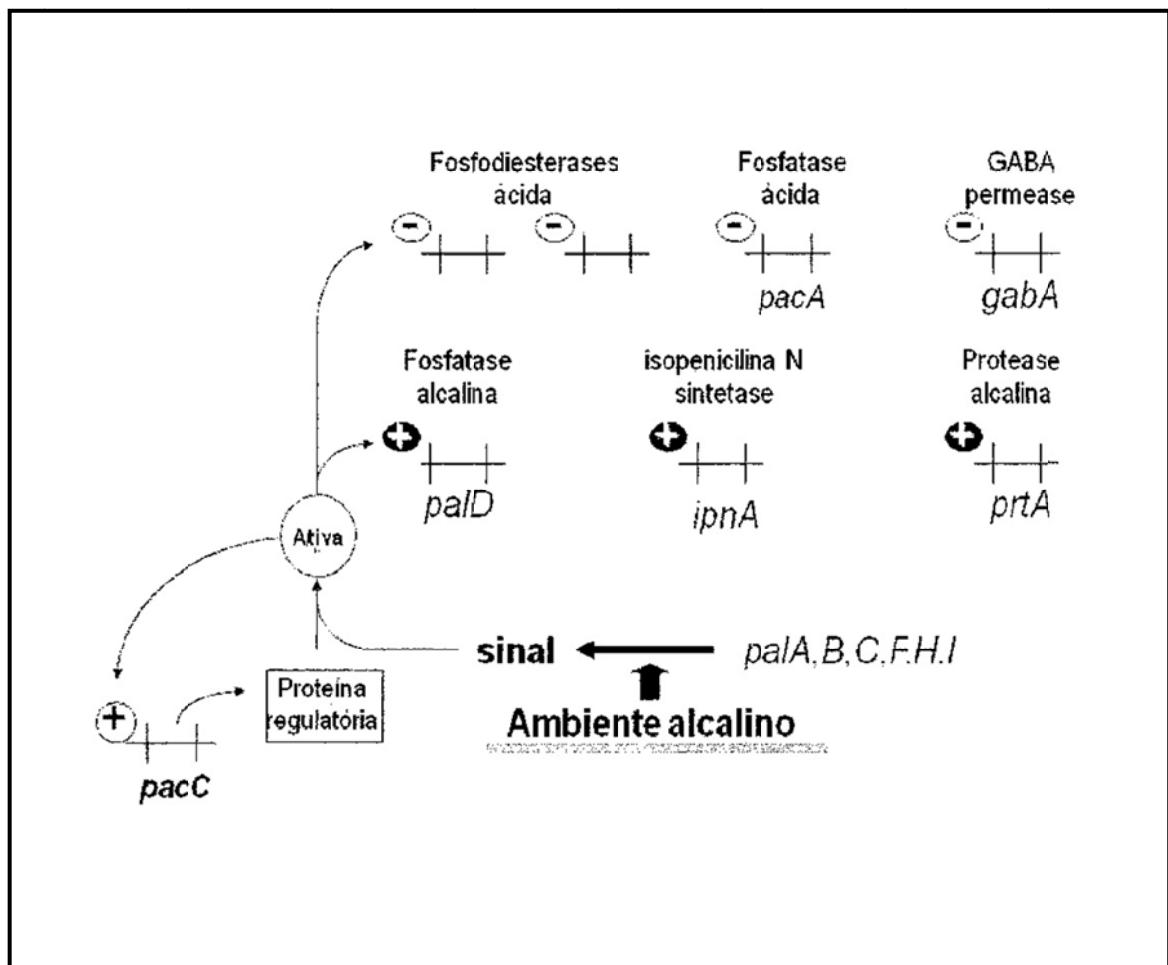


Figura 2: Regulação da expressão de proteínas pelo pH alcalino.

Fonte: Adaptação de Tilburn *et al.*, 1995.

O fator de transcrição PacC seria mantido inativo em pH ácido por interações intramoleculares na extremidade C-terminal. Em pH alcalino, os produtos dos genes *pal* introduzem uma modificação estrutural, ocasionando a quebra das interações intramoleculares e expondo uma região da proteína PacC à proteólise. Esta proteólise converteria PacC a uma forma ativa, capaz de induzir a transcrição de genes alcalinos e reprimir a transcrição de genes ácidos (Orejas *et al.*, 1995). Uma vez que *pacC* é autorregulado, a presença da proteína ativa levaria a uma maior expressão do gene *pacC* e conseqüentemente maior produção da proteína íntegra e, portanto, da forma ativa por proteólise. Assim, mutações na região C-terminal de *pacC* (linhagem *pacC^{c14}*) reduziriam as interações intramoleculares o suficiente para permitir proteólise na ausência do produto dos genes *pal*, resultando numa síntese contínua de PacC, independente do pH externo. Por outro lado, mutações nos genes da via de transdução de sinal do pH externo manteriam as interações intramoleculares intactas, resultando em uma proteína íntegra e inativa (Orejas *et al.*, 1995). No entanto, existem evidências de que o fator de transcrição PacC é funcional tanto em meio ácido como alcalino, e que os mecanismos moleculares envolvidos na regulação da expressão gênica pelo pH em *A. nidulans* dependem das condições nutricionais encontradas pelo fungo (Freitas *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2008; Freitas *et al.*, 2011).

Estudos mostram que a ativação de PacC em resposta à alcalinização extracelular envolve dois passos proteolíticos. O primeiro passo consiste no reconhecimento de dois motivos YPXL/I pela proteína PalA, localizados um em cada lado de uma sequência conservada de 24 resíduos de aminoácidos presente na forma íntegra de PacC e denominada *signalling protease box*. Em seguida, a clivagem de PacC é catalisada por PalB, uma protease da família das calpaínas, resultando numa forma intermediária de PacC (53 KDa). O segundo passo consiste em um processo independente do pH ambiente, no qual a forma intermediária é convertida na forma funcional de PacC, com 27 KDa (Arst e Penalva, 2003; Vincent *et al.*, 2003). Além disto, PalA interage com a proteína VPS32, uma proteína endocítica da classe E, componente do complexo multiprotéico ESCRT (Vincent *et al.*, 2003) que, em *Saccharomyces cerevisiae*, atua na sinalização do pH ambiente (Xu e Mitchell, 2001). PalB é uma calpaína da família das cisteína proteases, e seria a responsável pelo reconhecimento do sítio de proteólise e, portanto, da remoção de 180 resíduos da porção C terminal da proteína PacC. Entretanto, foi descrito que PalB também interage com VPS32 (Ito *et al.*, 2001) que forma um complexo com a proteína PalA, exercendo a proteólise de PacC. Neste contexto, as proteínas PalH e PalI (proteínas com domínio transmembrana) seriam provavelmente os sensores do pH ambiente (Denison *et al.*, 1998; Negrete-Urtasun *et al.*, 1999; Arst e Penalva,

2003; Peñas *et al.*, 2007).

A regulação da expressão gênica em resposta ao pH ambiente foi demonstrada em *N. crassa* por Nahas *et al.*, (1982), quando constatou-se que a fonte de carbono utilizada no cultivo influenciava a produção das fosfatases. Porém, na mesma fonte de carbono a secreção destas fosfatases é dependente do pH do meio de cultivo, ou seja, as fosfatases ácida e alcalina são preferencialmente secretadas em meio ácido e alcalino, respectivamente. Foi descrito ainda que o processo de secreção da fosfatase alcalina, e provavelmente de todas as outras enzimas relacionadas, é dependente da glicosilação da molécula enzimática, com consequente alteração nas propriedades funcionais da enzima (Palma *et al.*, 1989). Estas alterações estruturais podem explicar o aumento de atividade das fosfatases alcalinas, detectada quando o fungo é cultivado em meio alcalino, sugerindo que o número de cópias da fosfatase alcalina que o fungo sintetiza é o mesmo, independentemente do pH do meio de cultura (Palma *et al.*, 1989; Han *et al.*, 1994; Nozawa *et al.*, 1998). Esses estudos demonstraram que a síntese de fosfatase alcalina Pi-repressível em *N. crassa* não depende do pH ambiente, mas este determina a glicosilação da fosfatase alcalina secretada, ou seja, determina sua atividade (Palma *et al.*, 1989; Han *et al.*, 1994; Thedei Jr. *et al.*, 1994; Nozawa *et al.*, 2003a). Portanto, o monitoramento do pH extracelular é determinante na secreção seletiva, mas não na síntese dessa enzima em *N. crassa*.

Esses dados obtidos em *N. crassa* foram confirmados em *A. nidulans*. O gene *pacC-1* de *N. crassa* complementou a mutação *pacC^c14* de *A. nidulans*, restaurando as propriedades das fosfatases ácida e alcalina secretadas em pH 5,0. Este resultado revelou que o fungo *A. nidulans* possivelmente regula a secreção de enzimas por um mecanismo similar ao de *N. crassa* e que a mutação *pacC^c14* é uma mutação de perda de função (Nozawa *et al.*, 2003a).

Os genes *pal* estariam envolvidos somente na ativação de PacC, sendo assim o perfil de secreção e as propriedades das fosfatases ácidas secretadas deveriam ser idênticos na linhagem controle e em todos os mutantes *pal* com fenótipo perda de função. Entretanto, foi demonstrado que as fosfatases ácidas secretadas pelas linhagens mutantes *palA1*, *palB7*, *palC4* e *palF15* apresentam propriedades alteradas em relação àquelas secretadas pela linhagem controle, sugerindo que os *loci palA*, *B*, *C*, e *F* estão envolvidos em modificações pós-traducionais em fosfatases ácidas mediadores da resposta adaptativa ao pH extracelular (Maccheroni Jr. *et al.*, 1995). Além disso, resultados obtidos por *differential-display reverse transcription-PCR* (DDRT-PCR) revelaram alguns genes que se expressam diferencialmente nas linhagens parental e mutante *palB7* de *A. nidulans*, sendo que um deles codifica uma *O*-manosiltransferase. Esse gene não foi expresso na linhagem *palB7*, sugerindo que o gene *palB*

tenha um papel no processamento pós-transcricional de enzimas secretadas pelo fungo, além da possibilidade de participar na glicosilação da própria proteína PacC (Nozawa *et al.*, 2003b).

No dermatófito *T. rubrum* foi identificada uma proteína homóloga ao fator de transcrição PacC de *A. nidullans*, cuja inativação gênica demonstrou que o desenvolvimento em queratina e a consequente degradação desta molécula estão de alguma forma sob regulação deste gene, interferindo na secreção e/ou atividade de proteases que apresentam atividade ótima em pH alcalino (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006; Peres *et al.*, 2010).

Para o estabelecimento da infecção, *T. rubrum* precisa mobilizar uma maquinaria enzimática, em função do pH ambiente, baseada na expressão de proteases que estão ativas em uma ampla faixa de pH. Em 2004, foi proposto um modelo de regulação das enzimas proteolíticas pelo pH ambiente durante o processo infeccioso por dermatófitos (Figura 3). Nos estágios iniciais da infecção, ao entrar em contato com o pH ácido da pele, o patógeno sintetiza queratinases e proteases não específicas que atuam com atividade ótima em pH ácido. Estas atuam tanto em substratos queratinosos quanto em não queratinosos, gerando peptídeos que são hidrolisados em aminoácidos, que são utilizados pelo fungo como fonte de carbono, nitrogênio e enxofre. A metabolização de alguns aminoácidos, como a glicina, resulta na liberação de amônia elevando o pH do meio, adequando-o para ação das queratinases com atividade ótima em pH alcalino, o que possibilita a manutenção da infecção. Esta maquinaria metabólica permite que os dermatófitos utilizem proteínas para captação de nutrientes em um amplo espectro de pH, possibilitando a completa instalação, desenvolvimento e permanência do dermatófito no tecido hospedeiro (Martinez-Rossi *et al.*, 2004; Peres *et al.*, 2010).

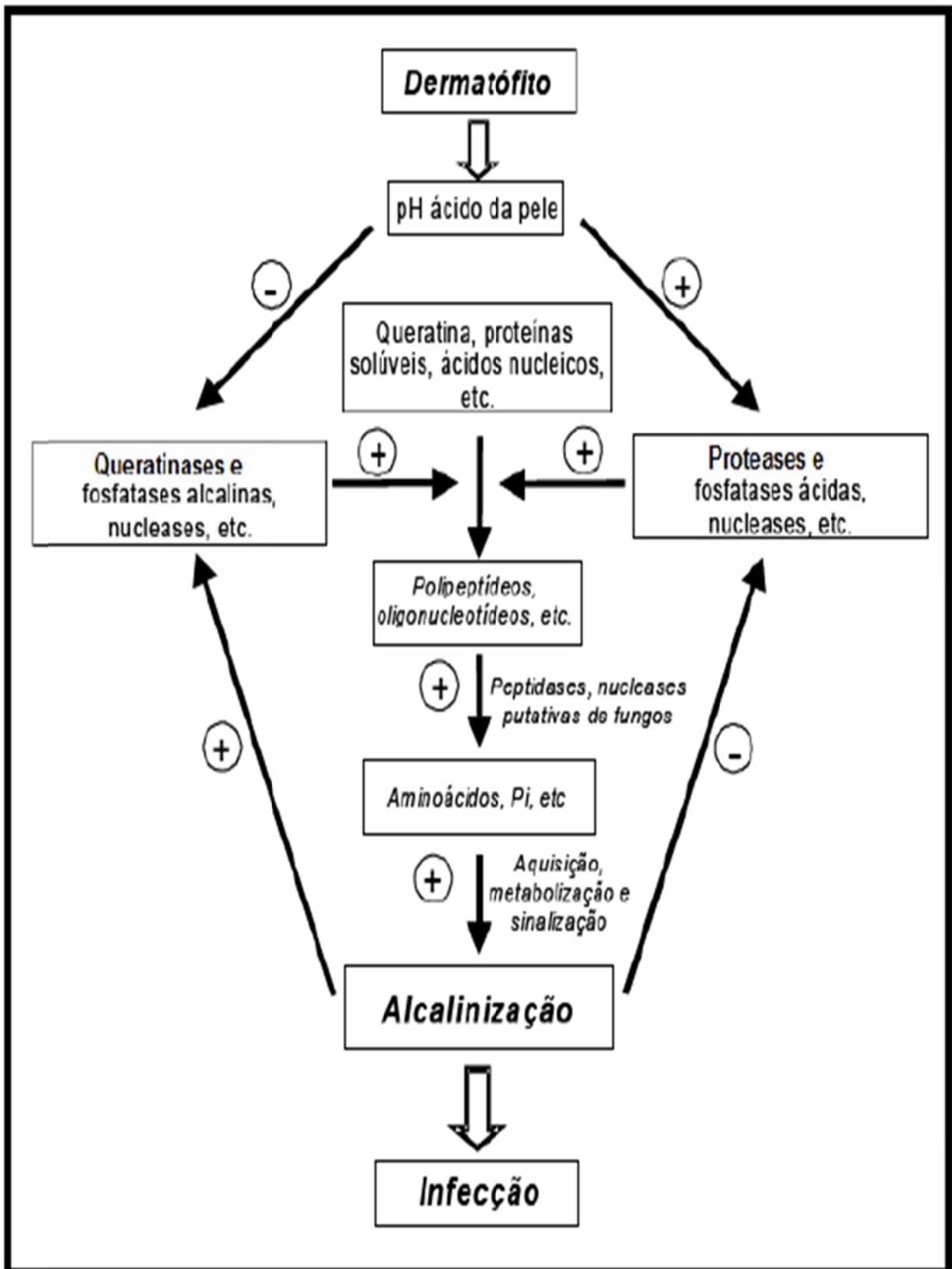


Figura 3: Modelo de regulação das enzimas proteolítica pelo pH ambiente, em dermatófitos.

Fonte: Martinez-Rossi *et al.*, 2004.

4 Glicosilação proteica

As proteínas recém sintetizadas e endereçadas para transporte e/ou secreção sofrem modificações pós-traducionais ainda no lúmen do Retículo Endoplasmático. Dentre elas, a mais comumente observada nos organismos é a glicosilação, formando as glicoproteínas. Neste processo são adicionados oligossacarídeos às proteínas que serão secretadas. Ao todo, foram identificados 13 monossacarídios e 8 diferentes aminoácidos envolvidos em no mínimo 37 ligações carboidrato-proteína, o que resulta na alta diversidade química e biológica destes compostos. As cadeias de oligossacarídeos das glicoproteínas afetam diretamente parâmetros como atividade biológica, conformação e estabilidade de proteínas secretadas e, no caso de proteínas de membrana celular, podem servir para adesão e mediar a comunicação entre as células (Crocker e Feizi, 1996; Deshpande *et al.*, 2008; Lommel e Strahl, 2009).

As proteínas têm um ou mais sítios potenciais para *N*-glicosilação ou *O*-glicosilação, que podem ou não ser glicosilados. Para que ocorra a *N*-glicosilação (Figura 4), é necessário que a proteína tenha a sequência de aminoácido consenso Asn-X-Ser/Thr (sendo X qualquer aminoácido com exceção da prolina). A ligação da proteína com o oligossacarídeo ocorre por meio do grupamento amida presente na asparagina da sequência consenso (Kukuruzinska, 2001; Munro, 2001). O passo inicial para a construção de *N*-glicanos é conservado entre as espécies, e consiste na construção de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$ e sua posterior ligação no carreador denominado dolicol fosfato. Após esta etapa, a estrutura de carboidratos é transferida para o peptídeo no retículo endoplasmático, onde ocorre parte do processamento da cadeia de oligossacarídeos, com a retirada de três resíduos de glicose e um de manose formando $\text{Man}_8\text{GlcNac}_2$. Assim, a glicoproteína é enviada para o complexo de Golgi, onde ocorrem outros processamentos, que são diferentes em humanos e leveduras. Em mamíferos, ocorre a retirada de mais resíduos de manose e adição de outros monossacarídeos como fucose, galactose e ácido siálico. Já em leveduras, ocorre a adição de resíduos de manose a fim de se criar o núcleo interno com 9 a 15 resíduos. Em alguns casos, ao núcleo interno pode ser adicionada uma cadeia externa composta basicamente por um esqueleto de $\alpha,1-6$ manose e ramificações de $\alpha, 1-2$ manose e $\alpha,1-3$ manose, podendo variar de 50 a 200 resíduos de manose. Este tipo de glicosilação está relacionado funcionalmente com estabilização proteica, ajudando o peptídeo a alcançar sua conformação e secreção corretas (Parodi, 2000; Munro, 2001; Kainz *et al.*, 2008).

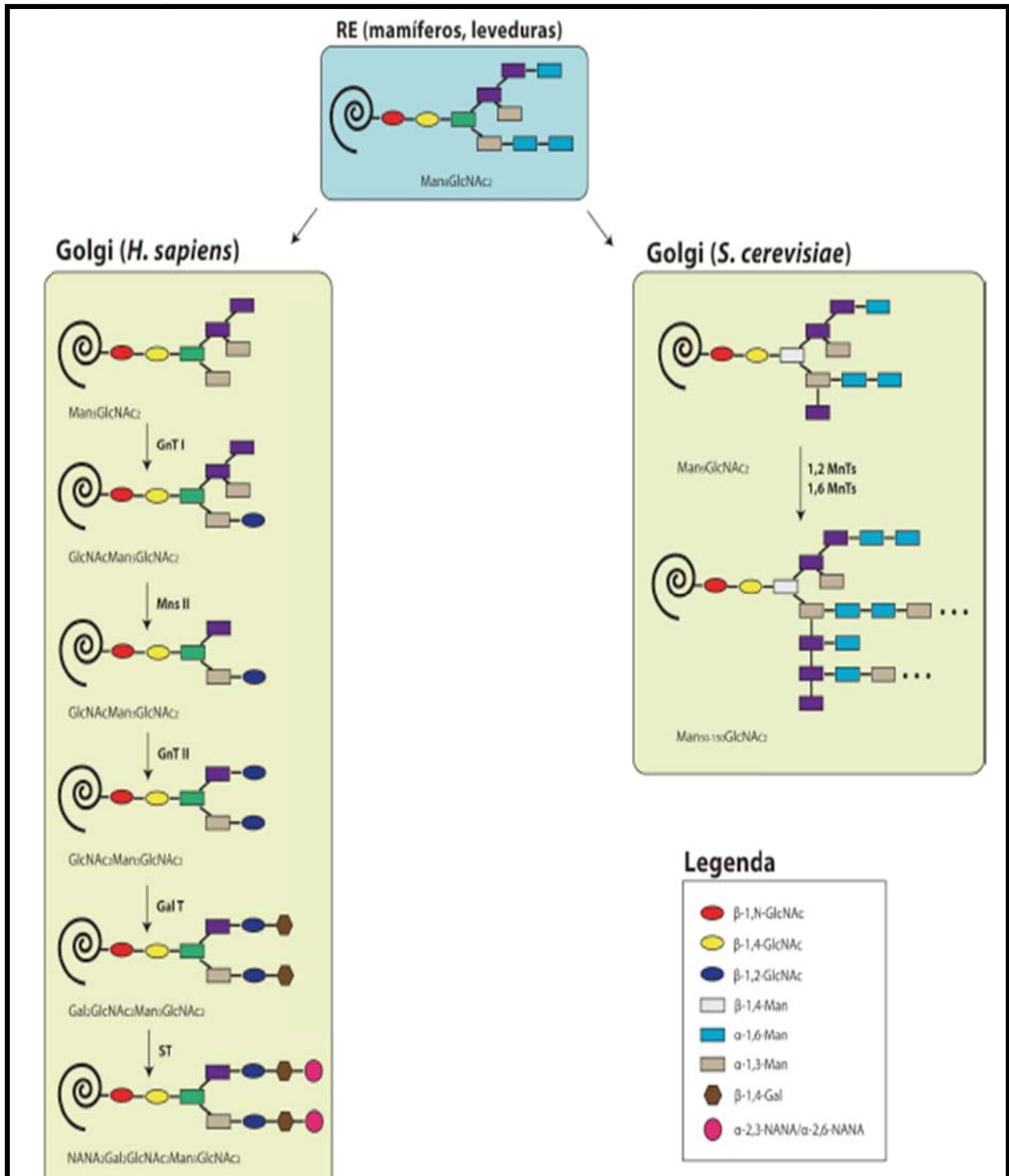


Figura 4: Principais vias de *N*-glicosilação em mamíferos e leveduras. R.E.: Retículo endoplasmático; GalT: Galactosiltransferase; GlcNAc: N-acetilglicosamina; GnTI: N-acetilglucosaminiltransferase I; GnTII: N-acetilglucosaminiltransferase II; Man: Manose; MnsII: manosidase II; MnTs: Manosiltransferase; NANA: Ácido N-acetilneuroamínico; ST: Sialiltransferase.

Fonte: (Rocha, 2010)

O processo de construção de glicanos *O*-manosilados é bem diferente em fungos e mamíferos, porém em ambos observa-se a adição de monossacarídeos no grupamento hidroxila de uma serina ou treonina. Em fungos, o passo inicial se dá no Retículo Endoplasmático, onde ocorre a adição de um resíduo de manose na proteína usando o dolicol fosfato manose (Man-P-Dol) como doador. Modificações adicionais à proteína *O*-ligada são feitas no Complexo de Golgi. A enzima responsável por este processo de transferência é a *O*-manosiltransferase, que tem sido muito estudada em *S. cerevisiae* e, atualmente, em outros fungos como *Schizosaccharomyces pombe* e *A. nidulans* (Willer *et al.*, 2005; Kriangkripipat e Momany, 2009).

Após a adição de manose no Retículo Endoplasmático, a glicoproteína é transferida para o Complexo de Golgi onde ocorre a elongação da cadeia de monossacarídeos. As cadeias de aminoácidos *O*-ligadas não contêm ramificações e geralmente tem, no máximo, de quatro a cinco resíduos de manose. Nesta via, o resíduo de manose é ligado à serina ou treonina de outra manose por ligações α e então estendido por ligações α -1,2 e α -1,3, dependendo da espécie do fungo (Figura 5). A *O*-glicosilação em fungos é essencial para estabilidade, função e localização de proteínas de membrana plasmática, afetando vários processos celulares como a manutenção e a polaridade celular, estando esta última relacionada com a morfologia do brotamento, sendo também importante na formação de glicoproteínas de parede celular envolvidas na adesão celular, funcionando como fator de virulência (Gemmill e Trimble, 1999; Willer *et al.*, 2005; Goto, 2007).

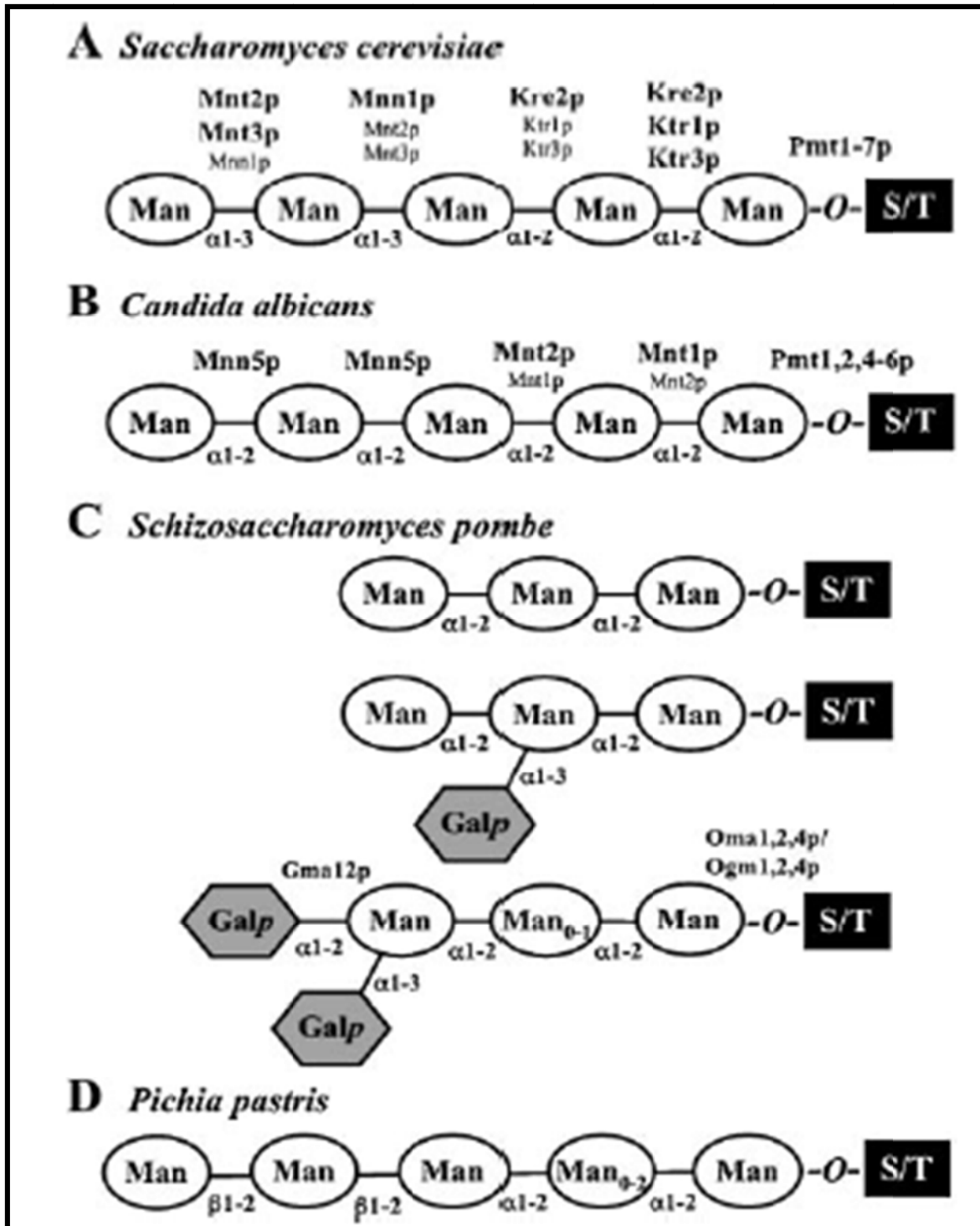


Figura 5: Processo de *O*-Glicosilação em diferentes espécies de fungos. Pmt: *O*-manosiltransferases; Mnts α -1,2 ou α -1,3- manosiltransferases; Man: Manose; Galp: Galactosil.

Fonte: Goto *et al.*,2007.

Sendo assim, o principal evento da *O*-glicosilação é a manosilação, ou seja, a adição de manoses à cadeia de polissacarídeos, cuja reação é catalisada por diferentes manosiltransferases. Deste modo, a manosilação de glicoproteínas, principalmente aquelas ligadas à membrana celular, se revela importante no processo de manutenção da integridade da parede celular e consequente virulência de algumas espécies fúngicas, uma vez que essas enzimas também atuam na adesão do organismo à célula do hospedeiro (Gentzsch e Tanner, 1996).

Em fungos, a *O*-manosilação tem se mostrado importante para o sensoriamento de condições de estresse, estabilização da parede celular e desenvolvimento celular. Em *S. cerevisiae*, o comprometimento da *O*-manosilação afeta a estabilidade, localização e função de proteínas da via secretória. Inúmeros processos celulares, tal como manutenção da estabilidade celular são afetados em mutantes. Quando a *O*-manosilação cai para um nível crítico, a maturação e ou estabilidade de muitas glicoproteínas podem ser perturbadas (Willer *et al.*, 2005; Lengeler *et al.*, 2008; Kriangkripiat e Momany, 2009).

Objetivos

II OBJETIVOS

1 Objetivos gerais

O objetivo geral deste projeto foi analisar a regulação da expressão gênica em resposta a variações ambientais no dermatófito humano *T. rubrum*.

2 Objetivos específicos

O objetivo específico deste trabalho foi analisar a expressão dos genes que codificam para as enzimas O-manosiltransferase (*O-mannosyltransferase*, TERG_06465.2) e N-manosiltransferase (*dolichyl-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-dolichyl mannosyltransferase*, TERG_06338.2) em resposta ao pH extracelular, à diferentes fontes de carbono, e ao gene *pacC*.

Justificativa

III JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos tem-se constatado um aumento na incidência de casos relatados de dermatofitoses, o que faz desta infecção um problema de saúde pública. Diante disso, é de fundamental importância o conhecimento dos aspectos moleculares e bioquímicos envolvidos no processo infeccioso causado pelo dermatófito *T. rubrum*.

Para causar infecção é necessário que este organismo se adapte ao pH da pele. Para tanto, o *T. rubrum* desenvolve uma maquinaria de indução e repressão de enzimas que atuam em uma ampla faixa de pH, com a função de captação de nutrientes para sua sobrevivência. Neste contexto, as queratinases têm um papel importante na hidrólise de queratina, que é sua principal fonte de nutrientes.

T. rubrum codifica uma proteína homóloga ao fator de transcrição PacC, descrita e bem caracterizada em organismos modelo como responsiva a cascata de sinalização do pH ambiente. A linhagem de *T. rubrum* que tem o gene *pacC* interrompido apresenta uma redução de sua atividade queratinolítica, indicando que de alguma forma este gene regula a síntese ou a secreção de queratinases.

A glicosilação proteica é importante para ativação de proteínas da via secretória e, em vários organismos é descrita sua função na formação de glicoproteínas de parede celular que são essenciais na adesão à célula do hospedeiro, funcionando como um fator de virulência. É bem conhecido que, esta forma de regulação pós traducional é influenciada pela fonte de carbono e pH ambiente.

Foi mostrado que nas linhagens *paba1palB7* e *paba1pacC^{c14}* de *A. nidulans*, o conteúdo de manose da glicoproteína PacA (fosfatase ácida Pi-repressível) é reduzido, e que na linhagem *paba1palB7* houve diminuição da expressão do gene que codifica uma *O*-manosiltransferase, indicando que tanto *palB* quanto *pacC* influenciam na glicosilação de proteínas. Sendo assim, este trabalho visou o melhor conhecimento da relação do perfil de expressão de enzimas de manosição e regulação pelo gene *pacC* no dermatófito *T. rubrum*, além da influência da composição do meio extracelular na expressão dessas manosiltransferases.

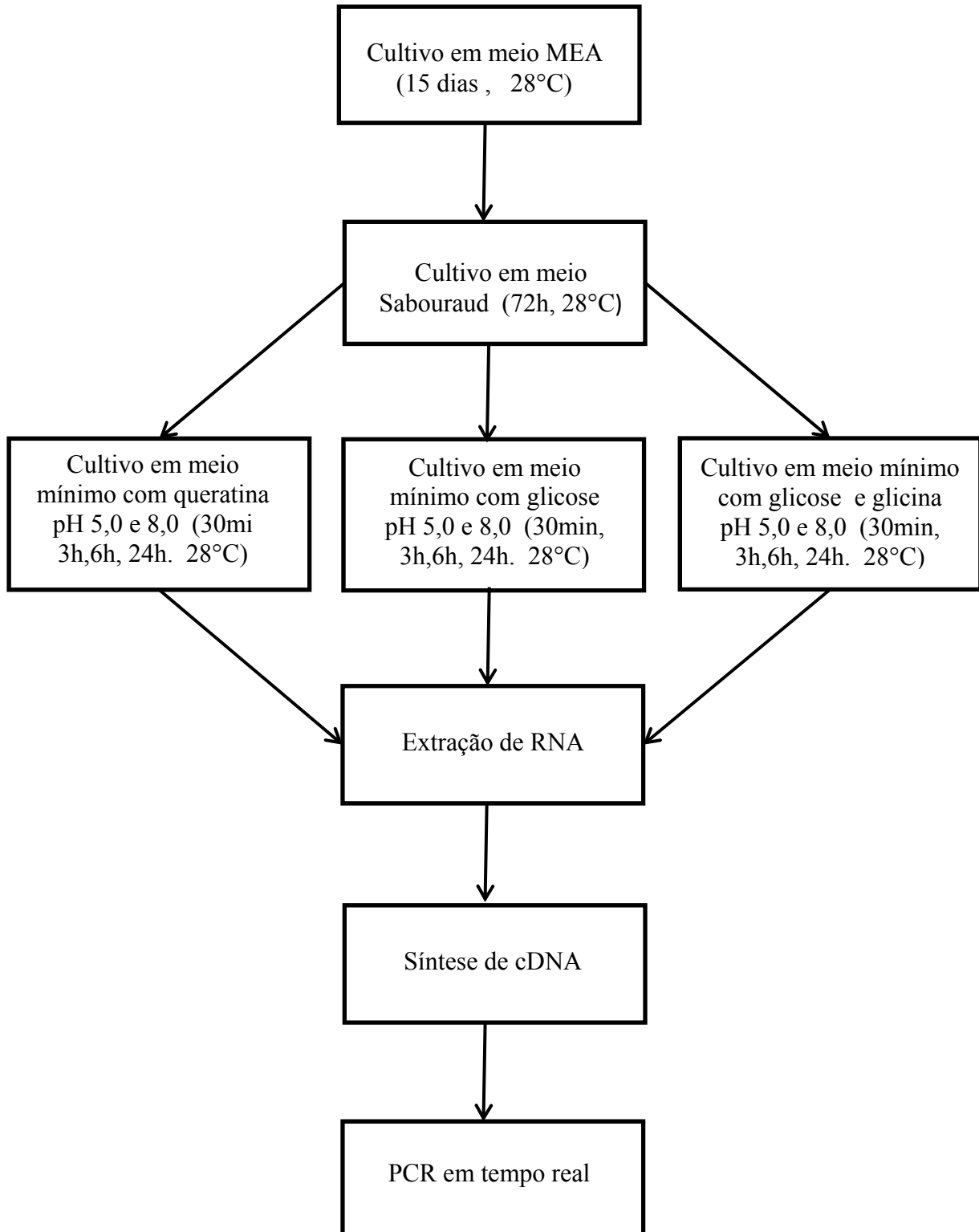
Portanto, o presente estudo torna-se importante para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na glicosilação de proteínas e na resposta a composição do meio extracelular, além de analisar a relação entre a glicosilação e o gene *pacC*, e sua importância no processo infeccioso.

Material e Métodos

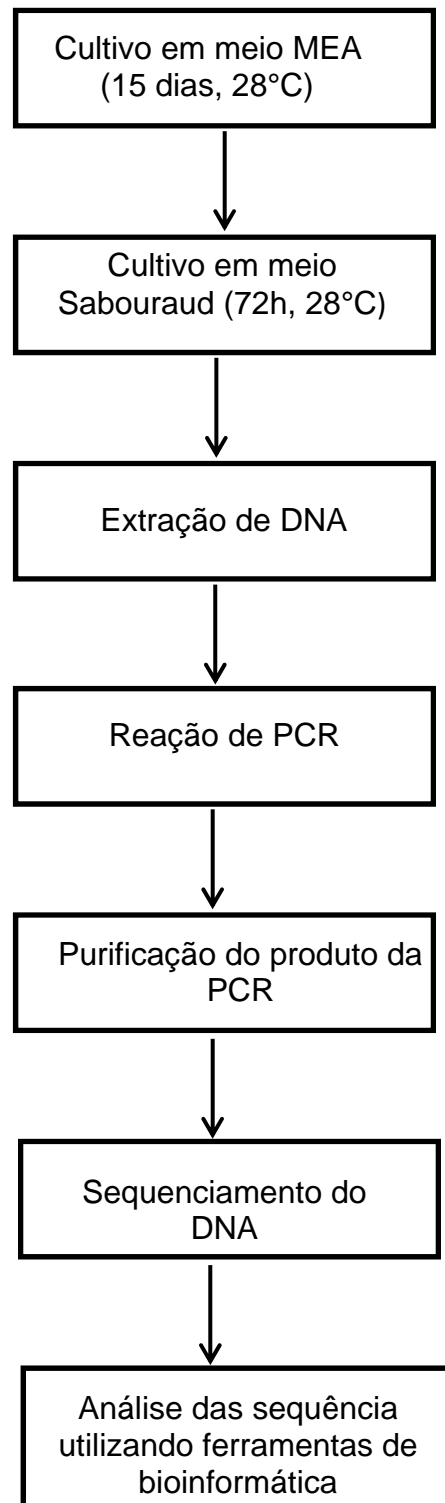
IV MATERIAL E MÉTODOS

1 Delineamento experimental

1.1 Delineamento dos experimentos de expressão gênica



1.2 Delineamento do sequenciamento dos produtos amplificados de cada gene



2 Linhagens utilizadas

As linhagens utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho, foram a selvagem H6 (ATCC MYA 3108) e a mutante *pacC-1* (Ferreira-nozawa, *et al.*, 2006) de *T. rubrum*. A linhagem H6 foi isolada de uma paciente do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto portadora de *tinea pedis*, e foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Cláudia M. Leite Maffei. A linhagem mutante *pacC-1* foi obtida em nosso laboratório a partir do isolado clínico H6 e possui o gene *pacC* interrompido pelo gene marcador de seleção que confere resistência a higromicina.

3 Condições para cultivo

3.1 Cultivo em meio sólido MEA (Meio Agar Extrato de Malte)

A linhagem H6 foi cultivada partindo-se de pequena quantidade de micélio, em placas de Petri contendo aproximadamente 30 mL de meio MEA, por 15 dias, a 28 °C.

A linhagem mutante *pacC-1* foi cultivada usando as mesmas condições, porém adicionando-se 450 µg/mL de higromicina no meio de cultivo.

3.2 Cultivo em meio Sabouraud líquido

Os conídios das linhagens de *T. rubrum*, cultivadas em meio MEA, foram recuperados em solução salina estéril 0,9%, constituindo uma suspensão que posteriormente foi filtrada em lã de vidro, em condições assépticas, para retirada do micélio e diluída para contagem dos conídios. O número de conídios foi estimado por contagem em câmara de Neubauer, em microscópio óptico. Cerca de 10⁶ conídios foram inoculados em 50 mL de meio Sabouraud líquido, utilizando-se frascos *Erlenmeyers* com volume de 500 mL, e incubados a 28 °C por 72 horas, sob agitação de 120 rpm. Este cultivo foi considerado o tempo zero.

Para o experimento de desrepressão, a massa micelial retirada do cultivo em meio Sabouraud foi transferida para o Meio Mínimo líquido (MM) pH 5,0 ou pH 8,0 variando-se a fonte de carbono (glicose, glicose e glicina ou queratina) tamponado ou não, retirando-se o cultivo nos tempos de 30 minutos, 3 horas, 6 horas e 24 horas, aferindo-se o pH do meio ao final de cada cultura.

4 Meios de cultura e soluções

4.1 Meio MEA (Atlas, 1993)

Reagentes	Quantidade
Extrato de malte	20 g
Glicose	20 g
Peptona	1 g
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

O pH do meio foi ajustado para 5,7. O meio foi autoclavado a 1 atm de pressão a 120°C por 20 min. Para preparação do meio sólido foi adicionado ágar para uma concentração 2,0 % (m/v).

4.2 Meio Sabouraud (Atlas, 1993)

Reagentes	Quantidade
Glicose	20 g
Peptona	10 g
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

O pH do meio foi ajustado para 5, 7. O meio foi autoclavado a 1 atm de pressão a 120°C por 20 min.

4.3 Meio Mínimo (Cove, 1966)

Reagentes	Quantidade
Solução de sais	20 mL
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

O pH do meio foi ajustado para 5,0 ou 8,0. O meio foi autoclavado a 1 atm de pressão a 120°C por 20 min. Este meio não contém fonte de carbono, a qual foi adicionada posteriormente de acordo com o delineamento experimental. Para todos os MMs, contendo as diferentes fontes de carbono analisadas, foi adicionado nitrato de sódio na concentração de 70mM como fonte de nitrogênio. Quando de interesse, foi utilizado como tamponante ou citrato de sódio em pH 5,0 ou Tris base em pH 8,0, ambos com concentração final de 50 mM.

Solução de sais (Cove, 1966)

Reagentes	Quantidade
Cloreto de potássio	26 g
Sulfato de magnésio heptahidratado	26 g
Fosfato de potássio monobásico	30 mg
Solução de elementos-traço	50 mL
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

Esta solução foi mantida em clorofórmio a 4 °C.

Solução contendo traços de elementos (Cove, 1966)

Reagentes	Quantidade
Borato de sódio decahidratado	40 mg
Sulfato de cobre pentahidratado	400 mg
Sulfato de ferro heptahidratado	532 mg
Sulfato de manganês monohidratado	292 mg
Molibdato de sódio bihidratado	800 mg
Sulfato de zinco heptahidratado	8 g
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

Esta solução foi mantida em clorofórmio a 4 °C.

4.3.1 Meio Mínimo contendo glicose

O meio mínimo foi suplementado com glicose como fonte de carbono em concentração final de 50 mM. O pH do meio foi ajustado para pH 5,0 ou pH 8,0.

4.3.2 Meio Mínimo contendo glicose e glicina

O meio mínimo foi suplementado com glicose e glicina como fonte de carbono, ambas em concentração final de 50 mM. O pH do meio foi ajustado para pH 5,0 ou pH 8,0.

4.3.3 Meio Mínimo contendo queratina

O meio mínimo foi suplementado com 2,5 g/L de queratina. O pH do meio foi ajustado para pH 5,0 ou pH 8,0.

5 Sequenciamento de DNA

A linhagem utilizada durante as etapas experimentais desse trabalho não possui seu genoma sequenciado. Portanto, com a finalidade de avaliar e confirmar se os fragmentos gênicos manipulados são homólogos ao do genoma de referência de *T. rubrum*, disponível no banco de dados de genoma estrutural, *Broad Institute* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative/MultiHome.html), tornou-se necessário o sequenciamento de cada gene caracterizado.

5.1 Extração de DNA

Após o cultivo em meio líquido Sabouraud, o micélio foi filtrado em funil de Buchner, lavado em solução fisiológica e macerado em nitrogênio líquido. A seguir, foi adicionado a cada 100 mg de micélio 1 mL de solução de lise (50 mM EDTA pH 8,0 e 1% SDS), a mistura foi incubada a 68 °C por 15 min. Após centrifugação a 10.000 x g por 10 min, foi adicionado 40 µL de acetato de potássio 5 M, incubado em gelo por 1 h, e a seguir centrifugado novamente a 10.000 x g por 10 min. A solução contendo o DNA foi transferida para um tubo limpo contendo 1 mL de isopropanol, o DNA foi coletado com o auxílio de uma pipeta Pasteur em forma de gancho e lavado com etanol 70%. Depois de seco para retirada do etanol o DNA foi eluído em tampão TE contendo RNase (2 µg/mL). A concentração do DNA genômico obtido foi determinada utilizando-se o aparelho Nanodrop[®] (Thermo), pela absorbância das preparações em 260 nm, utilizando $1_{OD260} = 40$ mg/mL de DNA como valor padrão. O grau de pureza foi avaliado pela relação OD 260/280 nm, que deve ser próxima a 2,0 para ácidos nucleicos.

Tampão TE (Tris-EDTA) (Sambrook *et al.*, 1989)

Reagentes	Quantidade
Tris-HCl	10 M
EDTA pH 8,0	1 M
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

O pH da solução foi ajustado para 8,0 e a solução autoclavada a 1 atm de pressão e 120 °C por 20 minutos.

5.2 Obtenção do produto de PCR

Para cada par de *primer* foi realizado uma reação de PCR. Em cada reação de PCR foram utilizados 100 ng/ μ l de DNA genômico, 2 μ l de tampão taq polimerase recombinante, 1,5 mM de MgCl₂, 200 μ M de dNTP (2,5 mM), 10 pmol de cada primer Forward e Reverse de cada gene ,0,5 U de Taq polimerase e o volume final foi completado para 25 μ l de reação com água deionizada esterilizada. A reação foi submetida por 2 min a 94°C, seguido de 40 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 60°C, 1 min a 72°C e uma extensão final de 10 min a 72°C. O produto da reação foi fracionado em gel de agarose 1,5%. Estas corridas foram feitas adicionando-se 100 ng de amostra ao tampão de corrida para amostra 1X. A mistura foi aplicada em gel de agarose 1,5% (m/v) e submetida à eletroforese por 4V/cm em tampão de migração TAE 1X.

Em seguida os fragmentos amplificados para cada par de *primer* foram visualizadas sob luz UV e recortados do gel para serem purificados, usando o *PureLink Quick Gel Extraction kit*[®] (GE Healthcare). Os fragmentos recortados do gel foram pesados (peso máximo de 300 mg), distribuídos em tubos *eppendorfs* de 1.5 mL, aos quais foram adicionados 10 μ L de tampão de captura para cada 10 mg de gel. Após agitação vigorosa as amostras foram incubadas a 60°C por 15-30 min (até a agarose ser totalmente fundida). Em seguida, cada uma das amostras foi transferida para uma coluna GFX, incubada à temperatura ambiente e centrifugada a 14.000 rpm por 1 min. Após a centrifugação, os DNAs de cada amostra ficaram retidos nas colunas GFX e foram recuperados após a lavagem destas colunas com 500 μ L de Wash Buffer e centrifugação a 14.000 rpm por 1 min. Após a centrifugação, foi aplicado sob a coluna 50 μ L de tampão de eluição e incubadas por 2 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 1 min e os DNAs de cada amostra foram coletados, quantificados e armazenados a -20°C.

Tampão de corrida para amostra 10X (Sambrook *et al.*, 1989)

Reagentes	Quantidades
Azul de bromofenol	0,25%
EDTA pH 8,0	1mM
Glicerol	50%

Tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) (Sambrook *et al.*, 1989)

Reagentes	Quantidades
Tris-base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA 0,5 M	100 mL
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

O pH foi ajustado para 8,0 e a solução autoclavada a 1 atm de pressão e 120 °C por 20 min.

5.3 Sequenciamento direto do produto de PCR

As reações de sequenciamento foram realizadas com o Kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* seguindo as recomendações do fabricante. Foram utilizados 200 a 400 ng de DNA, 3,2 pmol de oligonucleotídeo de interesse *Forward* ou *Reverse* e 2 µl do reagente *Big Dye*. As amostras foram desnaturadas por 2 min a 96°C, seguidos de 40 ciclos de 30 s a 96°C, 30 s a 52 °C e 4 min a 60 °C, e 10 min a 72°C para extensão final.

Após a ciclagem, as amostras foram precipitadas acrescentando-se 2 µl de uma solução contendo 1,5 mM de acetato de sódio e 250 mM de EDTA, e em seguida foi adicionado 80 µl de etanol absoluto. As amostras foram incubadas por 20 min no escuro à temperatura ambiente e centrifugadas a 4.000 rpm por 45 min, numa temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado lavado com 150 µl de etanol 70% (v/v) gelado e, em seguida, foi centrifugado em uma temperatura de 4 °C a 4.000rpm por 10 min. Depois de secas, as amostras foram ressuspensas com 2,5 µl de *Loading Color*, e 0,7 µl foram aplicados no gel de poliacrilamida para serem analisadas no sequenciador automático *ABI Prism 377 DNA Sequencer* (Perkin Elmer) (Applied Biosystems, Foster City, CA).

5.4 Análise das sequências

Primeiramente, os cromatogramas foram analisados quanto à qualidade pelo *software Phred* (Ewing e Green, 1998). As sequências aceitas contêm pelo menos 80 nucleotídeos com qualidade *Phred* maior ou igual a 20. A seguir, as sequências idênticas foram agrupadas em *contigs* através do programa CAP3 (Huang e Madan, 1999).

As sequências obtidas no sequenciamento foram analisadas utilizando-se os algoritmos BLASTn (Altschul *et al.*, 1997), buscando similaridade, com as sequências depositadas no banco de dados de *T. rubrum* previamente depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Bethesda, MD - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e no *Broad Institute*.

6 Extração de RNA

6.1 Obtenção do micélio para extração de RNA total

Após o cultivo em meio Sabouraud ou meio mínimo nas condições de interesse, o micélio de cada linhagem, selvagem e mutante, foi recolhido por filtração em funil de Buchner, prensados entre folhas de papel de filtro, para remover o excesso de água, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior extração de RNA total.

6.2 Tratamento da água com DEPC

Para evitar a degradação do RNA, a água destilada utilizada durante a extração de RNA total foi tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) 0,1% (v/v), e incubada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 18-20 horas. Após este tratamento, a água foi autoclavada por 30 minutos, a 1 atm de pressão e $120\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.3 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído com materiais livres de RNase. O reagente Trizol[®] (Invitrogen) foi utilizado para extração do RNA total das linhagens que foram cultivadas a partir do micélio obtido em meio líquido. Aproximadamente 50 mg de micélio foram macerados em cadinho primeiramente com auxílio de nitrogênio líquido, e em seguida com 1,0 mL de Trizol[®] (Invitrogen). A mistura foi transferida para um tubo de 1,5 mL, agitada vigorosamente e incubada à temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, foi adicionado 0,3 mL de clorofórmio e, após agitação, as amostras foram incubadas novamente à temperatura ambiente por 3 min e centrifugadas a 12.000 rpm por 15 min a 4°C . A fase aquosa foi precipitada com 0,5 mL isopropanol/mL de Trizol[®], incubada por 10 min à temperatura

ambiente e centrifugada a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C. O precipitado resultante foi lavado com etanol 75%, seco à temperatura ambiente por 30 min, ressuspensão em água tratada com DEPC (0,1% v/v) e incubado a 65 °C por 5 min para sua completa dissolução.

A concentração do RNA foi determinada no aparelho Nanodrop[®] pela absorbância das preparações em 260 nm, utilizando $1_{OD260} = 40$ mg/mL de RNA como valor padrão. O grau de pureza foi avaliado pela relação OD 260/280 nm, que deve ser próxima a 2,0 para ácidos nucleicos. As amostras de RNA foram tratadas com *RNase-free DNase- I* (Invitrogen), para retirada de qualquer DNA contaminante, submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, para verificação da integridade das amostras e, por fim, estocadas a -80 °C.

6.4 Eletroforese de RNA

As amostras de RNA foram preparadas em solução desnaturante contendo RNA na concentração desejada, 2 µL de tampão MOPS 5X, 3,5 µL de formaldeído 12,3 M (solução estoque), 10 µL de formamida e tampão de corrida 1X (o mesmo usado para o DNA). O volume final foi completado para 15 µL com água DEPC. A mistura foi incubada a 65 °C por 15 min, resfriada rapidamente em gelo e posteriormente, aplicada no gel de agarose 1,5% (m/v) desnaturante e submetidas à eletroforese por 4V/cm em tampão de migração MOPS 1X.

Tampão de migração MOPS 5X (Sambrook *et al.*, 1989)

Reagentes	Quantidades
Acetato de sódio 50 mM pH 7,0	800 mL
EDTA 0,5 M pH 8,0	10 mL
MOPS	20,6 g
Água tratada com DEPC (q.s.p.)	1000 mL

Gel de Agarose 1% para RNA (Sambrook *et al.*, 1989)

Reagentes	Quantidades
Agarose	1,0 g
Tampão MOPS 5X	19,64 mL
Formaldeído 12,3M	17,86 mL
Brometo de etídio	1 µL
Água tratada com DEPC (q.s.p.)	100 mL

7 PCR em tempo real

7.1 Construção dos *primers*

Para realizar a análise da expressão gênica quantitativa por tempo real foram construídos quatro pares de *primer*. Destes, dois pares são para genes endógenos que codificam α -actina e β -tubulina, e os outros dois para os genes de interesse; um codificando uma *O*-manosiltransferase e o outro uma *N*-manosiltransferase. A seguir, estão mostradas as sequências de cada gene obtidas no banco de dados de dermatófitos (*Broad Institute of Harvard and MIT*), destacando-se as sequências de cada par de *primer* construído.

7.1.1 Construção do *primer* para o gene da α -actina

A sequência do quadro 1 representa o gene TERG_06637.2 que codifica para α -actina. Partindo deste dado, foi desenhado um par de *primer*, como pode ser observado na região destacada. A área em cinza representa o íntron. Quadro 1: Sequência do gene da α -actina

```

ATGATTGGTATGGGCCAGAAGGACTCCTATGTTGGTGATGAGGCACAGTCAAACGTTGGTATCCTAACCCCTGCGATACCCCATCGA
GCACGGTGTGCTCACAAACTGGGATGACATGGAGAAGATATGGCATCACACCTTCTATAACGAACTCCGTGTCGCCCCAGAGGAGC
ACCCAGTTCTGTTGACTGAGGCCCCCATCAACCCAAATCCAACCGTGAGAAGATGACCCAGATCATCTTCGAGACCTTCAACGCC
CCAGCCTTCTACGTCCTCCATCCAGGCTGTGCTCTCCCTCTATGCCTCTGGTTCGTACCACCTGGTATCGTCTCGACTCCGGTGACGG
TGTCAACCCAGTTGTCCCATCTACGAAGGTTTCGCCCTGCCACACGCCATCTCCGAATTGACATGGCTGGCCGTGACTTGACCG
ACTACCTGATGAAGATTTTGGCCGAGCGTGGCTACAGCTTCTCTACCACCCGCAACGTTGAAATCGTCCGTGACATCAAGGAGAAG
CTCTGCTACGTGCGCCTCGACTTCCAGGAGGAGATCCAGACTGCGCCCGAGACTCCAGCCTCGAGAAGTCTACGAGCTTCCCGA
CGGTCAGGTCATCACCATTGGAAACGAGCGATTCCGTGCTCTGAGGCTCTCTTCCAGCCAGCGTCTCCGTCTCGAGCCATGCG
GTATCCACGTCACCACCTACACGCCATCATGAAGTGTGACGTGACGTCGAAAGGATCTCTACGAAACATTGTCATGGTATGT
TCTCTCTCTGTTGTCCTCTGTCAGTAAACAAAATATATAGATATGGTGTAACTTGTATGTGTAGTCTGGTGGTACCACCATGTA
CCCAGGTATCTGACCGTATGCAGAAGGATBACTACTGCTTTGCCCATCGTCGATGAAGGTCAAGATCATCGCTCCCCAGAGC
GCAAATACTCCGTCTGGATCGGTGGTTCTATTCTCGCTTCCCTTTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCTCCAAGCAGGAATACGAC
GAGTCCGGCCCATCCATTGTCCACCGAAAGTGCTTCTAA

```

Este jogo de *primer* tem uma temperatura de anelamento a 60°C. A região do íntron contém 72 nucleotídeos, sendo assim seu amplicon é de 182 nucleotídeos (com o íntron) ou 110 nucleotídeos (somente éxons).

7.1.2 Construção do primer para o gene da β -tubulina

A sequência do quadro 2 representa o gene TERG_07904.2 que codifica para a β -tubulina. Partindo deste dado, foi desenhado um par de *primer*, como pode ser observado na região destacada. A área em cinza representa o íntron.

Quadro 2: Sequência do gene da β -tubulina

```

ATGCGTGAATCGTAAGTCTAGCTTTCCCTGGTCCATCACTTCCCTCTATTTGTGCCGAAAAACACGACACGGTCTGCACAGG
CCAAGAAAGGGGGGAGGCGAGAGGGCCACCACACGACCATGTCCAGCGTGAAGGGAACAGGCTTCGAGTTTCACAATTCTCGCA
TAGCGAGCGTAGAGCTTCAGGCTAACGTGCATTTATCGTATAGGTCCATCTCCAAACCGGCAATGTGTAAGCTTTGATCGTTCCC
TGGTTCATCGTCAGGTACCCGTTTGGAGTTAACAATTGTTCAACATTAGGGTAACCAAATGGTGTGCTTTCTGGTGGAGCATTAC
GCGTTGCAGCATAATGTATATTTTCGTGTGCAATTATTAAGTACTGTTTACAGGCAAACCATGCTGGTGGAGCAGGCTTCGAT
GGATCCGGCCAGTGGAGTATTTTCGCTGGAAAAATTTTCCAAGTCTCGAGGGACATGAATGTTGACAACCTGGGATTTTATAGCTAC
ACCGGATCTTCTGACCTCCAATTGGAGCGCATGAATGTCTACTTCAACGAGGTGTGCACGACCAAGACCCCTCCCTTCAGCAGCAT
ACTAACTCATTTGGAGGCAAAGGCCCTCAAGCAAAAAATACGTTCCCGTGGCGGTGCTTGTGATCTTGAGCCCGCGCTCTCGATGC
TGTCCGTGCCGGTCTTTTCGGTCCAGCTCTTCCGCCCGATAACGTGCTTCCGGTCCAGTCCGGTGGCGAAACAACCTGGGCCAAGG
TGCTACTACACTGAGGGTGCCAACTTGGTCCGACAGGTTCATCGATGTTGTCCGTCCGTGAGGCGAAGGCTGGCAGTGCCTCCAGGGT
TTCCGAGATCACCCACTCCCTCGGTGGTGGTACCGGTGCTGGTATGGGTACCCTCCTGATCTCCAAGATCCGTGAAGAGTTCCGAGA
CCGTATGATGGCCACTTTTCCCGTGTCCCATCCCAATGGTCTCTGACACCGTTGTCGAGCCATACAACGCCACTCTTTCCATCC
ACCAGCTCGTTGAGCACTCCGACGAGACCTTCTGTATCGACAACGAGGTACGTTTTCTCTAGCTCCCTTAATTGGCCAGGGTTTG
GTATTTCTAACTGCTTGTAGGCTTGTATAACATCTGCATGAGAACCCTCAAGCTCACTAACCCATCCTACGGTGCCTCAACCAC
CTCGTCTCCGCCGTATGTCCGGTGTGAGCACCAGTCTTCGTTTCCAGGTCAGTTCAACTCTGACCTCCGCAAGTTGGCCGTCAA
CATGGTTCATTCCCTCGTCTCCACTTCTTCATGGTTGGATTTCGCTCCCTTACTAGCCGCAACGCCTACTCTTTCCGTGCTGTCT
CCGTCCGGAGTTGACCCAGCAGATGTTCCGATCCCAAGAATGATGGCTGCCACTGACTTCCGACGCGCCGCTACCTTACCTGC
TCTGCCATCTTGTAGGTACCCTAATTTATTAGTTCTATTCTTGGCTTCTCTTACTAACACCTGAATAGCCGTGGTAAGGTCTCCAT
GAAGGAGGTTGAGGACCAATGCGCAACATCCAGAACAAGAATCTGCTTACTTCTGTTGAAATGGATCCCAACAACGTCAGACCG
CTCTTTGCTCTATTCTCCAGTGGTCTCCAGATGTCCTTACTTTCGTCGGTAACTCCACCTCCATCCAGGAGCTCTTCAAGCGT
GTCGGTGACCAATCACTGCTATGTTCCGTAAGAAGGCTTTCTTGTCTGTGATGTTGTTGAGGATGAGGAGATGGAGTTTCAC
TGAGGCCGAGAACACATGAACGACTTGGTTCAGCGAATACCAGCAGTACCAGGATGCCTCCGTCTCCGACGGTGGAGGAAATAGT
AAGTATCTGCCTACCTATATAATATCCGTCTACCTATACGCTAACCAACTGCAGCCTTGAGGACGAGCAGCTTGAGGGCGAAG
AGTAA

```

Este jogo de primer tem uma temperatura de anelamento a 60 °C. A região do íntron contém 52 nucleotídeos, sendo assim seu amplicon é de 312 nucleotídeos (com o íntron) ou 253 nucleotídeos (somente éxons).

7.1.3 Construção do primer para o gene da *N*-manosiltransferase

A sequência do quadro 3 representa o gene TERG_06338.2 que codifica para uma *N*-manosiltransferase, ou somente *N*-man, e foi anotada pelo Broad Institute como *dolichyl-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-dolichyl mannosyltransferase*. Partindo deste dado, foi desenhado

um par de *primer*, como pode ser observado na região destacada. A área em cinza representa o íntron.

Quadro 3: Sequência do gene da *N*-man

```

ATGAGCCGGTTATGTACCATCGTGTAGACCTTCTCACAAACCCCAAACACTCGAGATGGATTTGTCGGCTGCTGTAGCGTTTCGATGC
ATGCCTATGTGCTGCTATCATATTTCAAAGTGCCGTGTAAGTCCCAGAGTTATTGCTACCGGTAGGATTTACTTCCCTCTCAAGGTACCCG
GTTAACTGACAGATGCTCAAACCAGACACCGAAATCGACTGGTCTACCTACATGCAACACATACACTTATTCCTTCCGGTGAAAGAG
ATTACATGGCGATTAAAGGGTCTACGGGGCCTCTCGTCTACCCTGCCGGCCATGTCTACGCCTATAACCGCTCTACATAATATGACCGAC
GAGGGACGTGACATCCCGTTGCGCAGATGCTGTTGCGGCTCTATATATATATATTCCTGGCAATTGTTATGGCATGTTATAGAGCAGT
ACATGCTCCGCCATATATATACCCCTCTTCGTGCTCTCAAAAAGATTGCACAGCATTTTCATGCTGCGGATGTTTAAATGATGGTCTCG
CTGCAGGTTTATCTGGGCAGCGATGTATATGATGC: TAAACGACAGTGGTATGCCG: TGTCTTGTATGGACGCTGAGTGTGAGCATA
AAAATGACAGGATTTGCTTGTCTCCCGCAATCGCGGTTATCCTTACATTTGCTGTAGGATTCGGGCAGGCATTGGGGATGGGAGTGT
CTTCGTATTGATACAGGTATGTTCTCTTTTGGTGCCTCTACCCATAGGTATTTAATTATCATTGAAGAAGATGATTAATTTATTCTA
TTCTAGATCTTACTTGGCCTACCTTTCCTTC: AGAGAACCACAGGCTACA: TGACAAGGGCGTTTGAGTTTACTCGACAGTTTCTGTT
CAAGTGGACCGTGAACCTGCGGTTTATCGGGGAGGATGTATTCTTGTCTAGATCTTCTCGGTTGCATTGCTAGCAGTGCACATAACTT
TGCTGGTGACTTTCCTGGCCTTTGCTGGATCATTCCCGCAAAAATGGACCTTGGTTCTTTAGTACAACAAGCATTCCGTGGACGAAAC
CTGCAACGTAGTATATCAAACCTCTACGTGCTACAACAATGATAACATCTGTGGTTATCGGCCTGCTCTGTGCACGGAGTTGCACTA
CCAATTCTATGCATATCTTGTGTGGACATCCCCCTGATACTATGAAAAGCGGTTTCCACTCAGTTCTTCTGTTTATTCTATGGGCTG
CGCAGGAATGGGCATGGAATGTCTATCCTAGCACAAACGTGAGCTCGACGATGGTAGTGGGTTGTCTCGCAATTCAGGTCCTAGGTGTG
TTCTGGGGGATGCAGTGTGAAGAATAA

```

Este jogo de primer tem uma temperatura de anelamento a 60 °C. A região do íntron contém 74 nucleotídeos, sendo assim seu amplicon é de 282 nucleotídeos (com o íntron) ou 208 nucleotídeos (somente éxons).

7.1.4 Construção do primer para o gene da *O*-manosiltransferase

A sequência do quadro 4 representa o gene TERG_06465.2 que codifica para uma *O*-manosiltransferase, ou simplesmente *O*-man, e foi anotada pelo *Broad Institute*, como *O*-mannosyltransferase. Partindo deste dado, foi desenhado um par de primer, como pode ser observado na região destacada. A área em cinza representa o íntron.

Quadro 4: Sequência do gene da *O-man*

```

ATGGCGCCGACGATAGAGCGTTTGGCTTCTGGCACCTCGCCGAACACAGACTTAAGGAGGAGAAAATGTCCTGGTGCAGAGAAGAG
CAGTGCCAAATGTCCCAATTCACAGCATTGAAGTCGACGGGAAGAACTGAAGGAGAGGATATGGCAGTCTCTTGAAACTGGATAGG
AGCCTTAAGTGATTTGGCTTGACGGCATGCTAACCTACTACCTGTTTCGGCTTACATAGTCCCCCTCCTTCTGTGAGATTTCTCGATGA
CTTGGAGAGTTCATGCCCCATTGATCTTCACTGCTCTGGCTTGCTTCACTCGTTTGTGGCGCATGGTCTCTCAGATATCGTTA
CGTGGGATGAAGCTCAGTAAGAAAACCGAGATTGATCCCTTTTCTATACAGGTTTTGGGTATATGGTTACTGATGATATCTGCTGC
GTCGCTCTAGTTTCGGGAAAATTTGGTTTCATACTACATCAAACGAGAATTCTACTTCGATGTCCACCCTCCGCTGGGTAAAATGCTT
ATTGGATTGTCCGGTTTCTCGGCTGGTTATAACGGATCTTTCGAAATCAAGTCTGGCGAGAAAATACCCCTCCGGAAGTCAACTACAC
CTTCATGCGTATCTTCAATGCTTTCTTCGGTATCATGTGCGTTCCACTTGGTACTATACTGCGCGAGAACTGAAATFCCGCGCTC
CAGCCGATGGCTTATCACCTGATGGTGCCTTTCGAGAACTCCTACGCCACGATTTCCAGATTATCCTTTTGGATTCTATGCTT
CTATGCTTACCTTACCCTACCCTTTGCTGGGCAAGATTCCACCAGACTTCGACATGAAAGCTTCTCCCCGAGTGGTATCTCTG
GCTCATCTTCACTGGCCTGAGCATTGGGTGTGTCTGCAAGTAAAAATGGGTCGGACTCTTCTGCACTGCACTGGTCCGCTTTTACA
CTGCTGAAGATCTCTGGCACAGTTTGGAGACCTAAAAATGCCAAAGGTAATCAGGCCCTTACCAGGATGTTACATTCGGTAGTT
GCTAACTATATGATAGACCGTCTTGGCTCATCACTTGGGAGCCCGTGTTCGCTGATCATCGTTCCATTTCTGGTCTATAT
GTTCTCTTCTACATTCATTTCTCGTGCTTGAGAACTCTGGCACCCTGACGCTCAGATGAGCTCTTGTCCAAGCTAACTTGA
GGGTACCAATGTTGGCAAGGACAGTCTCTTGGAGTCGCCATTGGATCCAAAATCACACTTAAGAATATGGGATACGGAGGTGGT
CTACTACACTCTCAGTTTCACTTATCCGAAGGATCGGGCCAGCAAGATCACTTGCTACCACCACAAGGACTCTAACACGA
CTGGTTTCACTATCCGAACCGTACTCAGCCGATTAATAATCCAGAAGTCCAATTGCCTTTATGGTGTGGTGCAGTGCATCCGCT
TTATCCAGCTCAGACCGGCCAACTTGCCTCTCACACCGTGGCAGCTCCCGTCAACAAGGCTCAGTATGAAGTGTCTGCCTAT
GGAACACCACTGTTGGTGTATGCCAAGGACCACTGGACCATCGAGGTCTCAAAGACGTTGCGTCAAGAGACAGGTCGAAAATCAG
AACTCTTACCCTGCCCCTCCGCTGCGCCATACTGTCTTAGGCTGTTATCTCAGAGCTGGCGGTGTTAGCTTGCCTCAGTGGGGTT
TCAAACAGATTGAGACTACCTGCACCAAGGAGAACCAGTCCATGGGAGCTGTATACTCACTGGAACATCGAGTCGATGTGAATGAA
AGACTATGTACTTCTTTCTCTCTTTTATAAATTATAACATGGGCTCTTATACTAACAATACCTGATATACAGTTCTCTCAAG
TGAACAGGCACTTACAAGTCGCCCTTCCCTCAAGGATTTTATCCATCTGAATGTTGCTATGATGAGTCCATAACCGCTCTTGTCC
CAGATCCAGATAAGCAAGATGACCTAGCATCGAAGTTCTGGCAATGGCCATTTCTTAATGTTGGACTCCGAATGTGCTCCTGGGAC
GACAATGTCGTCAAGTACTTCTCTTGGTAACCCATTGCTACTGCGGAGTACCCTGAGTTTGGGTGTTTTCAGTCTACTCTGT
CCTCTGGTATCTGCTTCCGCTGGCAACCGGCTATGACGAACCTCAGCATGGCCGACATCGACCACATCCACTATTCCGGCATTTACC
CCATGTGGGCTGGTCTCCACTACCTCCCTTTCATGATCATGGCCCGTGTACCTACGTCATCACTACTACCCGGCCTTGTAC
TTTGCTATCTTGACCATGGCTTTCTGTATTGACTGGTTCCTCAGAAGCTTAACCGGAAGTTCGAGTGGGCCATCTATTAGTCTCT
CTATGTTGTTATTTCATCGGCCTGTTGTGCTCTTCAAGGACATCGTTTTCGGCATGGAAGGCTCAAACCAGCAGTGGGAAGAGTCTC
AATTGGT TGAGCAGTTGGAAGATTGCCAACCGATAG

```

Este jogo de primer tem uma temperatura de anelamento a 60 °C. A região do íntron contém 72 nucleotídeos, sendo assim seu amplicon é de 201 nucleotídeos (com o íntron) ou 129 nucleotídeos (somente éxons).

7.2 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado utilizando-se o Kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription*[®] (Applied Biosystems) utilizando-se 2 mg de RNA total, tratado com 1U de *DNase-I*, foram submetidos à transcrição reversa utilizando-se 2 µL de tampão [10X], 0,8 µL [2,5X] dNTP mix, 2,0 µL [10X] *random primer*, 1,0 µL de *multiscribe reverse transcriptase*. O volume final foi completado com água DEPC esterilizada, e a reação foi incubada por 10 min a 25 °C, seguida por 2 h a 37 °C e finalmente, 5 min a 85 °C.

A concentração de cDNA de cada amostra foi determinada usando o aparelho *Nanodrop*[®], pela absorbância das preparações em 260 nm, utilizando 1_{OD260} = 35 mg/mL de cDNA como valor padrão. O grau de pureza foi avaliado pela relação OD 260/280 nm que, para este tipo de amostra, deve ser próxima a 2,0. Determinada a concentração, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% e a seguir estocadas a -20 °C.

7.3 Curvas de dissociação e eficiência dos oligonucleotídeos

As análises por PCR quantitativa em tempo real foram realizadas utilizando-se a metodologia de detecção por *SYBR Green*, de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems), no aparelho *StepOnePlus Real Time PCR* (Applied Biosystems).

O primeiro passo da análise do PCR em tempo real foi à realização da curva de dissociação para exclusão de produtos inespecíficos da reação. Para tanto, foi realizada a quantificação absoluta de cada gene analisado, inclusive dos genes de referência, utilizando diluições seriadas de cDNA de 25ng, 50ng, 100ng, 200ng e 400ng, para calcular a eficiência da reação e, conseqüentemente, a qualidade dos oligonucleotídeos. A reação consistiu de amplificação, seguida da realização de uma curva de dissociação. Os valores de inclinação (*slope*) e de R² fornecidos após a construção da curva de regressão linear foram utilizados para a avaliação da eficiência da reação (E).

O segundo passo consistiu na reação de PCR em tempo real propriamente dita. Sendo assim, foi realizada a quantificação relativa para avaliar a expressão gênica nas diferentes condições de estudo. Cada reação, realizada em um volume final de 12,5 µL, continha 100 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 6,25 µL de *SYBR Green* (PCR mix) e 1 µL (50 ng) de cDNA. As condições de ciclagem foram um passo inicial de 2 minutos a 50 °C e 10 min a 95 °C, seguindo-se de 40 ciclos de 95 °C por 15 seg e 60 °C por 1 min.

Os iniciadores foram desenhados com o auxílio do software *Gene runner* (<http://www.generunner.net/>), cujos parâmetros foram ajustados para que todos apresentassem temperatura de pareamento a 60 °C.

7.4 Normalização e cálculo da expressão gênica relativa

Para as análises de expressão gênica foi utilizado a programa Genex (<http://genex.gene-quantification.info/>). Neste programa, a quantificação relativa dos genes de interesse foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizando-se os dados com dois controles endógenos, também denominados genes de referência, cuja expressão não varie significativamente entre as amostras analisadas. A quantificação relativa da expressão gênica é usada para descrever variação na expressão do gene de interesse, em um grupo de amostras em relação a uma amostra de referência, denominada calibrador, que neste caso, foi a amostra com menor ΔCt . O cálculo desta expressão relativa utiliza os valores de Ct dos controles endógenos, neste caso actina e tubulina, que foram subtraídos dos valores de Ct dos genes

alvos, obtendo-se assim o ΔCt de cada amostra. O valor de ΔCt do calibrador foi então subtraído do valor de ΔCt das demais amostras, para obter o $\Delta\Delta Ct$. Finalmente, as quantificações relativas dos genes foram expressas, em escala logarítmica, como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Scheffé *et al.*, 2006).

7.5 Análise estatística dos dados de PCR em tempo real

Para a análise dos dados, utilizou-se o teste estatístico *One-way ANOVA* por meio do *software* estatístico *GraphPad* (<http://www.graphpad.com/instat/instat.htm>).

Resultados

V RESULTADOS

1 Sequenciamento da região de amplificação e respectivos *primers* utilizados nos experimentos de PCR em tempo real

As sequências gênicas disponíveis no *Broad Institute* correspondem à linhagem de *T. rubrum* CBS118892. Entretanto, a linhagem utilizada neste trabalho foi isolada de um paciente do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-USP. Por este motivo, foi realizado o sequenciamento das regiões gênicas entre os pares de *primers*, com a finalidade de verificar identidade das sequências, e a amplificação da região gênica correta. Após o sequenciamento, foi feito o alinhamento das sequências obtidas com as sequências do banco de dados, utilizando o programa CLUSTAL X (1.83) - *multiple sequence alignment* (<http://www.clustal.org>).

1.1 Sequenciamento do gene α -actina

A região de amplificação do gene que codifica para a α -actina possui um íntron de 72 nucleotídeos. Portanto, para confirmar a sequência foram utilizados tanto o cDNA, sequenciando somente a região de éxon, quanto o DNA genômico que abrange também o íntron. O quadro 5 mostra o alinhamento destas sequências, juntamente com a sequência obtida do *Broad Institute*. As sequências alinhadas apresentam 100% de identidade, indicando que são idênticas à disponível no banco de dados.

Quadro 5: Alinhamento do gene da α -actina

Broad	AACGCCATCATGAAGTGTGACGTCGACGTCGAAAGGATCTCTACGGAAACATTGTCATG	60
gDNA	AACGCCATCATGAAGTGTGACGTCGACGTCGAAAGGATCTCTACGGAAACATTGTCATG	60
cDNA	AACGCCATCATGAAGTGTGACGTCGACGTCGAAAGGATCTCTACGGAAACATTGTCATG	60

Broad	GTATGTTCTCTCTCTTGTGTCCCTCTGCAGTAACAAAATATATAGATATGGTGCTAAC	120
gDNA	GTATGTTCTCTCTCTTGTGTCCCTCTGCAGTAACAAAATATATAGATATGGTGCTAAC	120
cDNA	-----	
Broad	TTGTATGTGTAGTCTGGTGGTACCACCATGTACCCAGGTATCTCTGACCGTATGCAGAAG	180
gDNA	TTGTATGTGTAGTCTGGTGGTACCACCATGTACCCAGGTATCTCTGACCGTATGCAGAAG	180
cDNA	-----TCTGGTGGTACCACCATGTACCCAGGTATCTCTGACCGTATGCAGAAG	108

Broad	GA	182
gDNA	GA	182
cDNA	GA	110

1.2 Sequenciamento do gene da β -tubulina

A região de amplificação do gene que codifica para a β -tubulina possui um íntron de 59 nucleotídeos. Portanto, para confirmar a sequência, foram sequenciados os produtos utilizando como molde o cDNA e o DNA genômico. O quadro 6 mostra o alinhamento destas sequências, juntamente com a sequência obtida do *Broad Institute*. As sequências alinhadas apresentam 100% de identidade, indicando que são idênticas à disponível no banco de dados.

Quadro 6: Alinhamento do gene da β -tubulina

Broad	CCGTATGATGGCCACTTTCTCCGTTGTCCCATCCCCAATGGTCTCTGACACCGTTGTCGA	60
cDNA	CCGTATGATGGCCACTTTCTCCGTTGTCCCATCCCCAATGGTCTCTGACACCGTTGTCGA	60
gDNA	CCGTATGATGGCCACTTTCTCCGTTGTCCCATCCCCAATGGTCTCTGACACCGTTGTCGA	60

Broad	GCCATACAACGCCACTCTTTCCATCCACCAGCTCGTTGAGCACTCCGACGAGACCTTCTG	120
cDNA	GCCATACAACGCCACTCTTTCCATCCACCAGCTCGTTGAGCACTCCGACGAGACCTTCTG	120
gDNA	GCCATACAACGCCACTCTTTCCATCCACCAGCTCGTTGAGCACTCCGACGAGACCTTCTG	120

Broad	TATCGACAACGAGGTACGTTTTCTCTAGCTCCCTTAATTGGCCAGGGTTTGGTATTTCT	180
cDNA	TATCGACAACGAGG-----	134
gDNA	TATCGACAACGAGGTACGTTTTCTCTAGCTCCCTTAATTGGCCAGGGTTTGGTATTTCT	180

Broad	AACTGCTTGTAGGCCTTGTATAACATCTGCATGAGAACCCTCAAGCTCACTAACCCATCC	240
cDNA	-----CCTTGTATAACATCTGCATGAGAACCCTCAAGCTCACTAACCCATCC	181
gDNA	AACTGCTTGTAGGCCTTGTATAACATCTGCATGAGAACCCTCAAGCTCACTAACCCATCC	240

Broad	TACGGTGACCTCAACCACCTCGTCTCCGCCGTCATGTCGGTGTGTCAGCACCAGTCTTCGT	300
cDNA	TACGGTGACCTCAACCACCTCGTCTCCGCCGTCATGTCGGTGTGTCAGCACCAGTCTTCGT	241
gDNA	TACGGTGACCTCAACCACCTCGTCTCCGCCGTCATGTCGGTGTGTCAGCACCAGTCTTCGT	300

Broad	TTCCAGGTCAG	312
cDNA	TTCCAGGTCAG	253
gDNA	TTCCAGGTCAG	312

1.3 Sequenciamento do gene *N-man*

A região de amplificação da *N-man* possui um íntron de 74 nucleotídeos, e assim, foram também sequenciados os produtos de amplificação utilizando o cDNA e o DNA genômico. O quadro 7 mostra o alinhamento destas sequências, juntamente com a sequência obtida do *Broad Institute*. As sequências alinhadas apresentam 100% de identidade, indicando que são idênticas à disponível no banco de dados.

Quadro 7: Alinhamento do gene da *N*-man:

Broad	TAAACGACAGTGGTATGCCGGTGTCTTGCTATGGACGCTGAGTGTGAGCATAAAAAATGAC	60
gDNA	TAAACGACAGTGGTATGCCGGTGTCTTGCTATGGACGCTGAGTGTGAGCATAAAAAATGAC	60
cDNA	TAAACGACAGTGGTATGCCGGTGTCTTGCTATGGACGCTGAGTGTGAGCATAAAAAATGAC	60

Broad	AGGATTGCTTGCTGCTCCCGCAATCGCGGTTATCCTTACATTTGCTGTAGGATTCGGGCA	120
gDNA	AGGATTGCTTGCTGCTCCCGCAATCGCGGTTATCCTTACATTTGCTGTAGGATTCGGGCA	120
cDNA	AGGATTGCTTGCTGCTCCCGCAATCGCGGTTATCCTTACATTTGCTGTAGGATTCGGGCA	120

Broad	GGCATTGGGGATGGGAGTGTCTTCGTATTGATACAGGTATGTTCTCTTTTGGTGC-CCT	179
gDNA	GGCATTGGGGATGGGAGTGTCTTCGTATTGATACAGGTATGTTCTCTTTTGGTGC-CCT	179
cDNA	GGCATTGGGGATGGGAGTGTCTTCGTATTGATAC-----TTCTAGATC	180

Broad	CTACCCATAGGTATTTAATTATCATTGAAGAAGATGATTAATTTATTCTATTCTAGATC	239
gDNA	CTACCCATAGGTATTTAATTATCATTGAAGAAGATGATTAATTTATTCTATTCTAGATC	239
cDNA	-----TTCTAGATC	208

Broad	TTACTTGGCCTACCTTTTCCTTCTAGAGAACCCAACAGGCTACA	282
gDNA	TTACTTGGCCTACCTTTTCCTTCTAGAGAACCCAACAGGCTACA	282
cDNA	TTACTTGGCCTACCTTTTCCTTCTAGAGAACCCAACAGGCTACA	208

1.4 Sequenciamento do gene *O*-man

A região de amplificação do gene da *O*-man apresenta um íntron de 74 nucleotídeos e, portanto, foram sequenciados os produtos de amplificação com o cDNA e o DNA genômico. O quadro 8 mostra o alinhamento destas sequências, juntamente com a sequência obtida do *Broad Institute*. As sequências alinhadas apresentam 100% de identidade, indicando que são idênticas à disponível no banco de dados.

Quadro 8: Alinhamento do gene da *O*-man

Broad	CCATGGGACGTGTATACTCACTGGAACATCGAGTCGCATGTGAATGAAAGACGTATGTAC	60
cDNA	CCATGGGACGTGTATACTCACTGGAACATCGAGTCGCATGTGAATGAAAGAC-----	52
gDNA	CCATGGGACGTGTATACTCACTGGAACATCGAGTCGCATGTGAATGAAAGACGTATGTAC	60

Broad	TTCTTTTCTCTCCTTTTATAACTTTATAACATGGGCTCTTTATACTAACATACCTGATAT	120
cDNA	-----TTCTTTTCTCTCCTTTTATAACTTTATAACATGGGCTCTTTATACTAACATACCTGATAT	120
gDNA	TTCTTTTCTCTCCTTTTATAACTTTATAACATGGGCTCTTTATACTAACATACCTGATAT	120

Broad	ACAGTTCCTCCAAGTGAACCAGGCACTTACAAGTCGCCCTTCCTCAAGGATTTTATCCAT	180
cDNA	---TTCTCCAAGTGAACCAGGCACTTACAAGTCGCCCTTCCTCAAGGATTTTATCCAT	108
gDNA	ACAGTTCCTCCAAGTGAACCAGGCACTTACAAGTCGCCCTTCCTCAAGGATTTTATCCAT	180

Broad	CTGAATGTTGCTATGATGACG	201
CDNA	CTGAATGTTGCTATGATGACG	129
gDNA	CTGAATGTTGCTATGATGACG	201

2 Valores do pH ao final de cada cultivo

Após cada cultivo o pH do meio foi aferido utilizando-se um pHmetro calibrado. Para tanto, foi utilizado meio mínimo contendo diferentes fontes de carbono, sendo o pH inicial 5,0 ou 8,0.

A Tabela 1 mostra os valores de pH ao final de cada cultivo para a linhagem H6 de *T. rubrum*, partindo-se de meio ácido. No meio mínimo sem tamponamento, observa-se com 30 minutos de cultivo e em todas as fontes nutricionais, uma variação do pH para aproximadamente 6,8. Porém, em 3 e 6 horas de cultivo o pH diminui para aproximadamente 5,0 em todas as fontes de carbono. Entretanto, em 24 horas de cultivo nota-se um aumento do pH para aproximadamente 6,2 quando utilizou-se queratina ou glicina e glicose como fonte de carbono. Estas variações não são observadas para glicose como única fonte de carbono, visto que nesta condição o pH se mantém em torno de 5,0 em todos os tempos de cultivo. Em condições de tamponamento o pH do meio se mantém aproximadamente como o inicial.

Tabela 1: Valores de pH aferido para o meio de cultivo da linhagem H6 de *T. rubrum* após desrepressão em meio mínimo contendo várias fontes de carbono em pH inicial 5,0*

Tempo de cultivo	Fontes de Carbono		
	Glicose	Glicose e Glicina	Queratina
MM			
30min	6,6 ± 0,3	6,8 ± 0,4	6,8 ± 0,2
3h	5,2 ± 0,1	4,8 ± 0,1	5,1 ± 0,1
6h	5,0 ± 0,1	4,9 ± 0,2	5,0 ± 0,1
24h	5,0 ± 0,3	6,2 ± 0,4	6,2 ± 0,1
MM tamponado			
30min	5,1 ± 0,3	5,0 ± 0,1	5,1 ± 0,3
3h	4,8 ± 0,2	5,1 ± 0,2	4,8 ± 0,3
6h	4,9 ± 0,3	5,0 ± 0,2	4,9 ± 0,2
24h	5,1 ± 0,2	5,2 ± 0,1	5,0 ± 0,2

* O micélio utilizado foi proveniente de cultivo em meio Sabouraud com pH final de 7,2 ± 0,2.

Para analisar o papel do fator de transcrição PacC na sinalização do pH extracelular e na modulação da expressão dos genes da *O*-man e *N*-man, os mesmos cultivos foram

realizados utilizando uma linhagem de *T. rubrum* que apresenta o gene *pacC* interrompido pelo gene de resistência a higromicina B. A Tabela 2 apresenta os valores de pH obtidos ao final de cada cultivo para a linhagem *pacC-1*, em meio ácido. Nota-se que os valores de pH para a linhagem *pacC-1* tanto em meio Sabouraud quanto nos cultivos em meio mínimo com diferentes fontes de carbono, com pH inicial 5,0, manteve-se praticamente os mesmos observados para a linhagem H6.

Tabela 2: Valores de pH aferido para o meio de cultivo da linhagem *pacC-1* de *T. rubrum* após desrepressão em meio mínimo contendo várias fontes de carbono em pH inicial 5,0*

Tempo de cultivo	Fontes de Carbono		
	Glicose	Glicose e Glicina	Queratina
MM			
30min	6,8 ± 0,2	6,6 ± 0,3	6,8 ± 0,2
3h	5,1 ± 0,3	5,2 ± 0,2	5,1 ± 0,1
6h	5,2 ± 0,1	5,0 ± 0,1	5,0 ± 0,1
24h	5,0 ± 0,3	6,2 ± 0,3	6,2 ± 0,1
MM tamponado			
30min	5,1 ± 0,3	5,0 ± 0,2	5,1 ± 0,3
3h	4,8 ± 0,2	5,1 ± 0,1	4,8 ± 0,3
6h	4,9 ± 0,3	4,9 ± 0,2	4,9 ± 0,2
24h	5,0 ± 0,2	5,0 ± 0,2	5,0 ± 0,2

* O micélio utilizado foi proveniente de cultivo em meio Sabouraud com pH final de 7,4 ± 0,3.

A Tabela 3 mostra os valores de pH ao final de cada cultivo para a linhagem H6 de *T. rubrum*, partindo-se do meio alcalino. Podemos observar que em meio mínimo sem tamponamento, com 30 minutos, 3 horas e 6 horas de cultivo e em todas as fontes nutricionais, ocorre uma variação do pH para aproximadamente 7,2; porém em 24 horas de cultivo nota-se um pequeno aumento do pH para aproximadamente 7,6 quando utilizou-se queratina ou glicina e glicose como fonte de carbono, o que não é observado para glicose como única fonte de carbono neste mesmo tempo de cultivo, visto que nesta condição o pH sofre diminuição para um valor aproximado de 6,7. Em condições de tamponamento o pH do meio se mantém aproximadamente como o inicial.

Tabela 3: Valores de pH aferido para o meio de cultivo da linhagem H6 de *T. rubrum* após desrepressão em meio mínimo contendo várias fontes de carbono em pH inicial 8,0*

Tempo de cultivo	Fontes de Carbono		
	Glicose	Glicose e Glicina	Queratina
MM			
30min	7,1 [±] 0,2	7,2 [±] 0,2	7,0 [±] 0,2
3h	7,1 [±] 0,3	7,1 [±] 0,3	7,1 [±] 0,3
6h	7,2 [±] 0,1	7,2 [±] 0,1	7,2 [±] 0,1
24h	6,7 [±] 0,2	7,6 [±] 0,2	7,5 [±] 0,2
MM tamponado			
30min	7,8 [±] 0,1	7,9 [±] 0,2	7,8 [±] 0,1
3h	7,9 [±] 0,3	7,9 [±] 0,2	7,9 [±] 0,1
6h	8,1 [±] 0,1	8,0 [±] 0,1	8,0 [±] 0,2
24h	7,8 [±] 0,2	8,0 [±] 0,2	7,9 [±] 0,2

* O micélio utilizado foi proveniente de cultivo em meio Sabouraud com pH final de 7,6[±]0,3.

A Tabela 4 mostra os valores de pH após o cultivo da linhagem *pacC-1* em meio alcalino. Pode-se notar que os valores de pH da linhagem *pacC-1* tanto em Sabouraud quanto em meio mínimo, com pH inicial 8,0, manteve-se praticamente os mesmos observados para a linhagem H6.

Tabela 4. Valores de pH aferido para o meio de cultivo da linhagem *pacC-1* de *T. rubrum* após desrepressão em meio mínimo contendo várias fontes de carbono em pH inicial 8,0*

Tempo de cultivo	Fontes de Carbono		
	Glicose	Glicose e Glicina	Queratina
MM			
30min	7,1 [±] 0,2	7,2 [±] 0,2	7,2 [±] 0,2
3h	7,0 [±] 0,2	7,1 [±] 0,2	7,1 [±] 0,3
6h	7,2 [±] 0,2	7,2 [±] 0,1	7,2 [±] 0,2
24h	6,8 [±] 0,2	7,6 [±] 0,2	7,5 [±] 0,2
MM tamponado			
30min	7,8 [±] 0,1	7,8 [±] 0,2	7,8 [±] 0,1
3h	7,9 [±] 0,2	7,9 [±] 0,1	8,1 [±] 0,1
6h	7,9 [±] 0,1	8,0 [±] 0,1	8,0 [±] 0,2
24h	8,0 [±] 0,2	8,0 [±] 0,2	7,9 [±] 0,2

* O micélio utilizado foi proveniente de cultivo em meio Sabouraud com pH final de 7,4[±]0,3.

3 Expressão dos genes *N-man* e *O-man* de *T. rubrum* em resposta a diferentes fontes nutricionais e modulação do pH extracelular (ou *shift* de pH)

Os gráficos a seguir mostram o perfil de expressão dos genes *O-man* e *N-man* nas linhagens H6 e *pacC-1* de *T. rubrum*, cultivadas em pH 5,0 ou 8,0, utilizando glicose, ou glicose e glicina, ou queratina como fonte nutricional.

As Figuras 7 e 8 mostram o perfil de expressão da *O-man* durante os cultivos em meio ácido (pH 5,0), das linhagens H6 e *pacC-1*, respectivamente. Observamos que, na linhagem H6, este gene (Figura 6) apresentou aumento nos níveis relativos de expressão quando cultivada em queratina como fonte de carbono e uma diminuição dos níveis de expressão em glicina e glicose como fontes de carbono. Este mesmo gene, na linhagem mutante (Figura 7), apresentou maiores níveis de expressão quando cultivada em glicose e glicina e níveis menores de expressão quando cultivada em queratina. Quando analisamos a expressão do gene da *N-man*, nos cultivos em pH 5,0, notamos que na linhagem selvagem (Figura 8) houve diminuição nos níveis de expressão quando cultivada em queratina como fonte de carbono. Porém, na linhagem mutante (Figura 9) observamos um aumento na expressão deste mesmo gene com queratina como fonte de carbono. Verificou-se ainda que, na linhagem mutante, o tamponamento não interferiu nos níveis de expressão do gene. Porém, na linhagem selvagem, ocorre uma indução em 6 h com queratina e uma repressão em 3 h de cultivo em glicose.

Nas figuras referentes ao cultivo em pH 8,0 (Figuras 10 - 13) quando comparados os perfis obtidos nas diferentes fontes de carbono para *O-* e *N-*manosiltransferase, nota-se um perfil de expressão gênica semelhante para ambas linhagens.

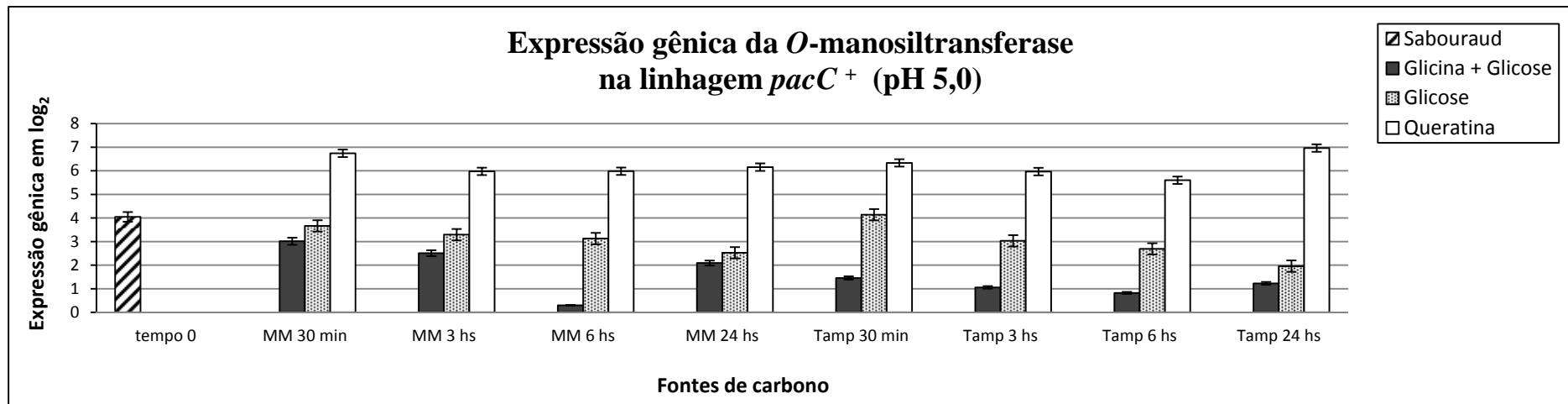


Figura 6: Expressão gênica da *O*-man na linhagem H6 (*pacC*⁺) em pH 5,0. (Análise estatística ANOVA; P<0.05).

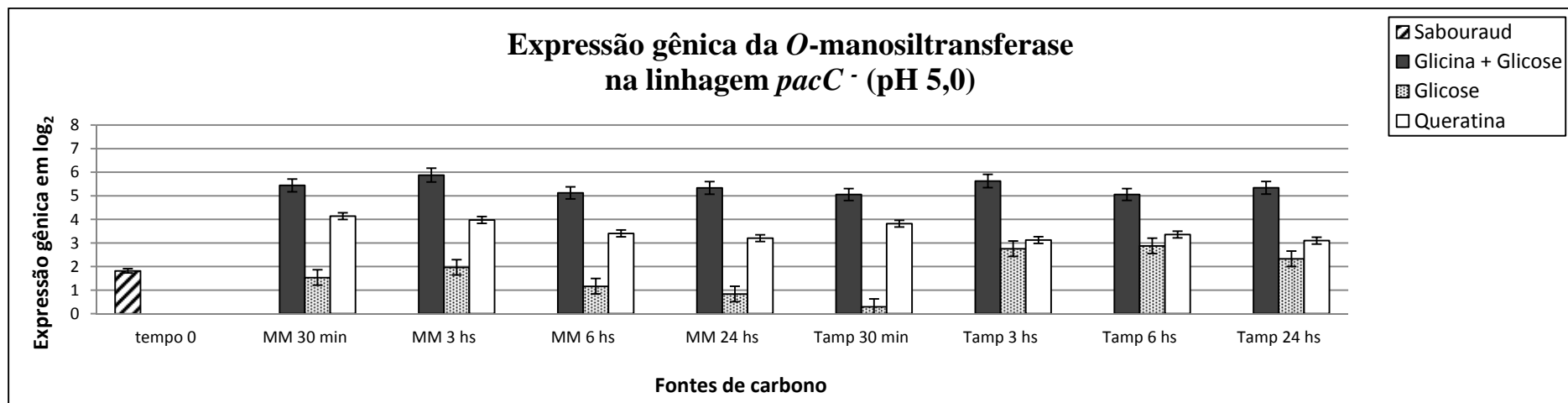


Figura 7: Expressão gênica da *O*-man na linhagem *pacC*⁻¹ (*pacC*⁻) em pH 5,0. (Análise estatística ANOVA; P<0.05).

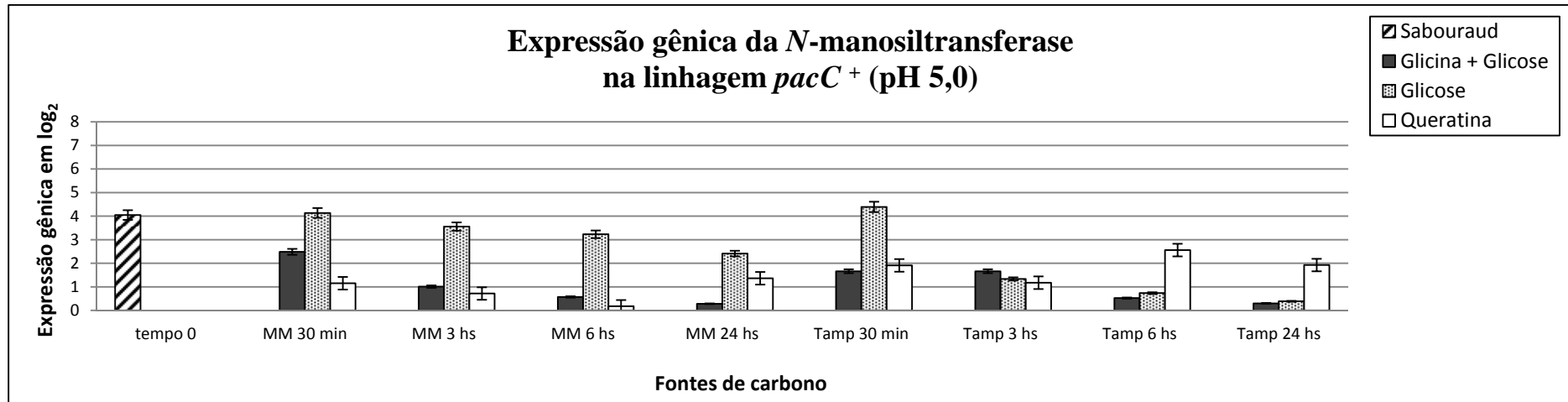


Figura 8: Expressão gênica da *N*-man na linhagem H6 (*pacC*⁺) em pH 5,0. (Análise estatística ANOVA; $P < 0.05$).

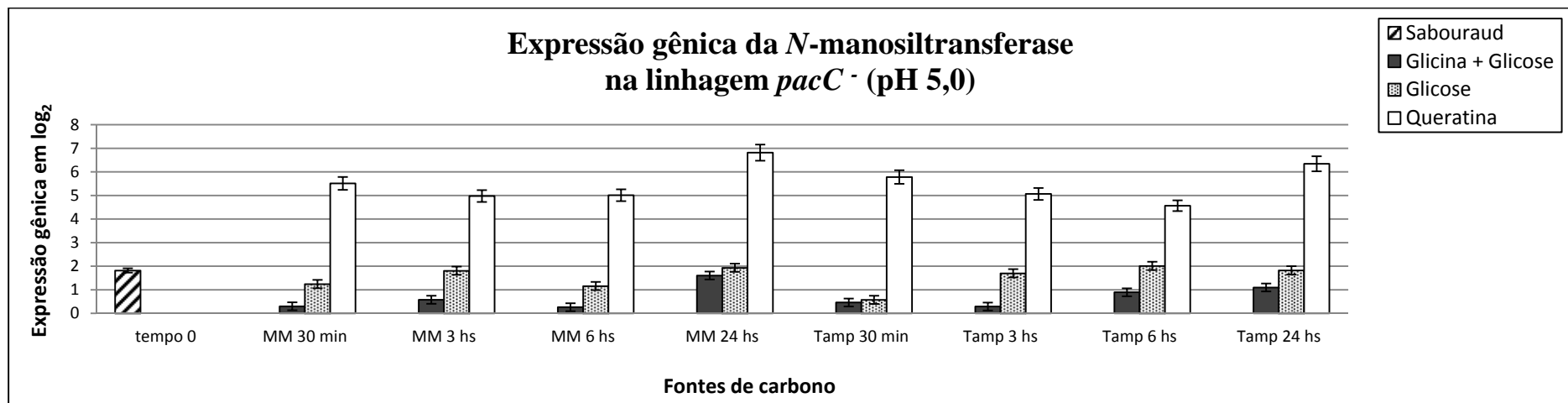


Figura 9: Expressão gênica da *N*-man na linhagem *pacC*⁻ em pH 5,0. (Análise estatística ANOVA; $P < 0.05$).

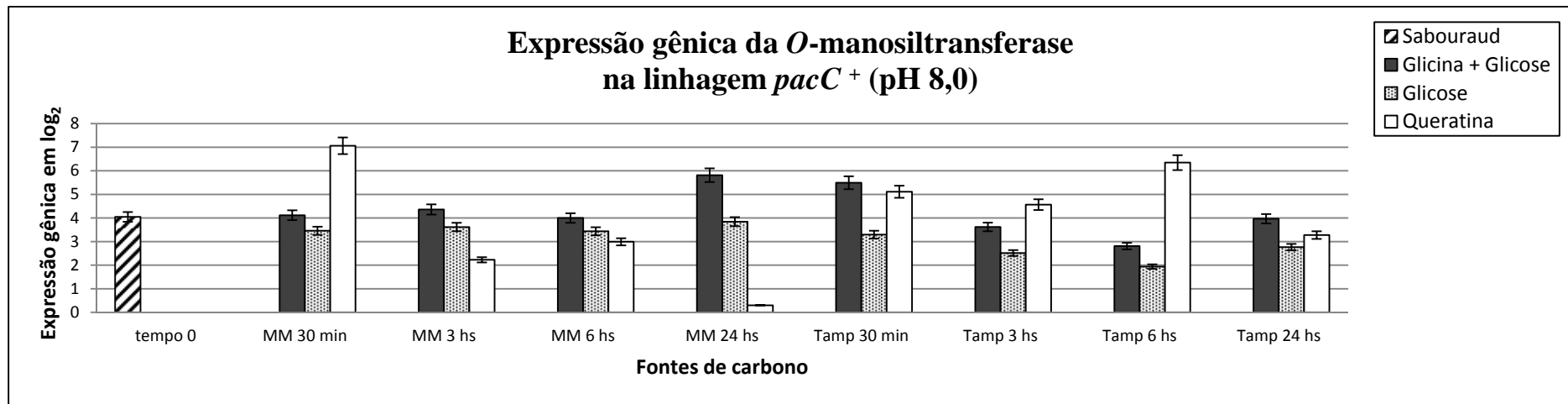


Figura 10: Expressão gênica da *O*-man na linhagem H6 (*pacC*⁺) em pH 8,0. (Análise estatística ANOVA; $P < 0.05$).

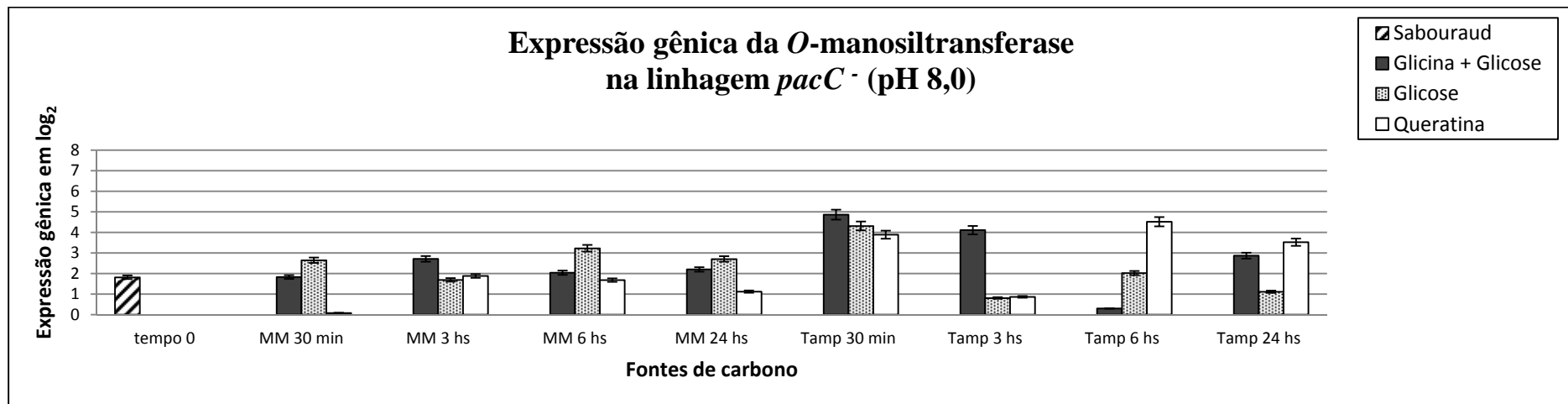


Figura 11: Expressão gênica da *O*-man na linhagem *pacC*⁻ (*pacC*⁻) em pH 8,0. (Análise estatística ANOVA; $P < 0.05$).

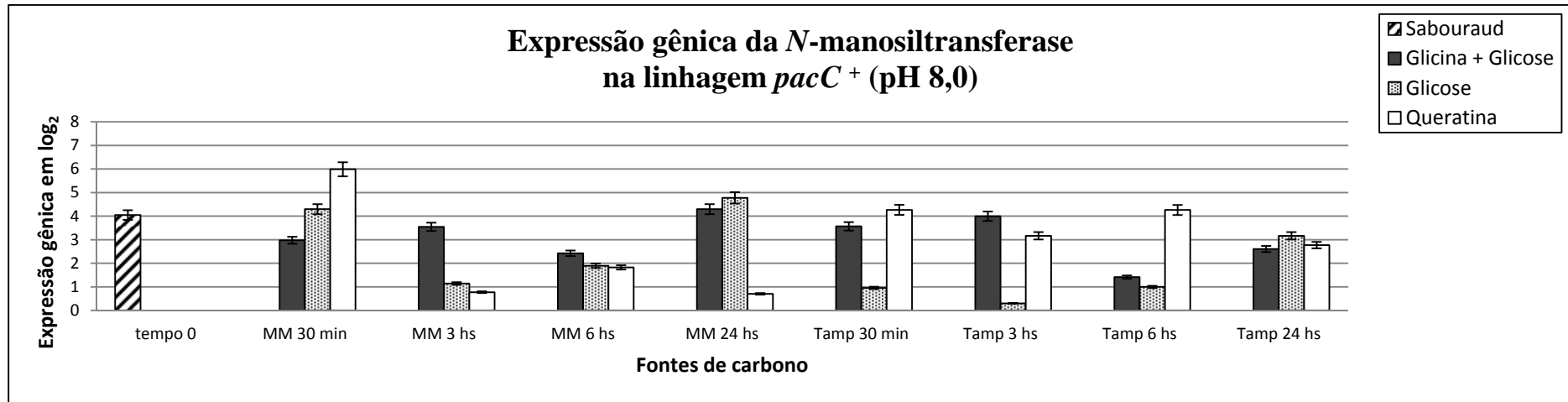


Figura 12: Expressão gênica da *N*-man na linhagem H6 (*pacC*⁺) em pH 8,0. (Análise estatística ANOVA; $P < 0.05$).

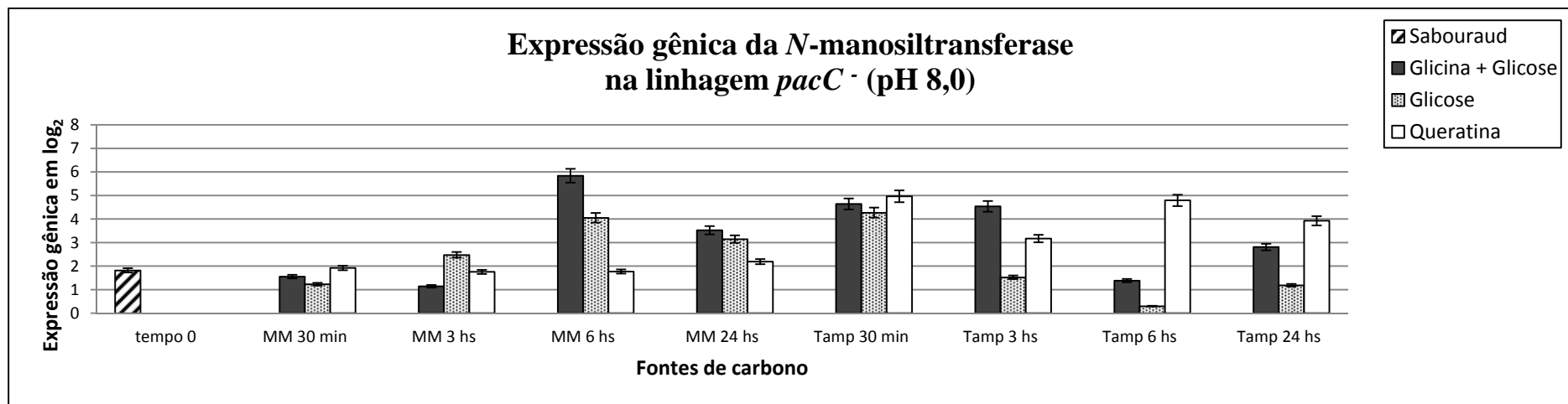


Figura 13: Expressão gênica da *N*-man na linhagem *pacC*⁻1 (*pacC*⁻) em pH 8,0. (Análise estatística ANOVA; $P < 0.05$).

Discussão

VI DISCUSSÃO

1 Modulação do pH extracelular em função da fonte nutricional

Os fungos filamentosos desenvolvem uma resposta fisiológica frente a mudanças ambientais (como alteração do pH, fonte de carbono, nível de fosfato, etc.) alterando o padrão de expressão gênica. Tais alterações levam a uma resposta adaptativa que pode envolver vias metabólicas intracelulares, síntese e secreção de moléculas e captação de nutrientes.

No dermatófito *T. rubrum* o crescimento *in vitro* é dependente do pH inicial do meio de cultura, sendo ótimo em pH ácido. Quando as culturas são suplementadas com glicina como fonte de carbono, o pH do cultivo aumenta atingindo valores entre pH 8,3 - 8,9, o que não ocorre em meio contendo apenas glicose (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2003).

Como já descrito anteriormente, verificou-se em 24 horas um aumento do pH na presença de queratina ou glicina mais glicose. Porém, em glicose o pH se manteve em torno de 5,0. Uma explicação para este fato é que quando alguns aminoácidos, como a glicina, são utilizados como fonte de carbono, sua metabolização libera amônia no meio extracelular, alcalinizando-o (Thedei Jr. *et al.*, 1994; Mansour *et al.*, 2008; Peres *et al.*, 2010). Vale ressaltar que a alcalinização do meio proporciona um ambiente adequado para a atuação da maioria das proteases queratinolíticas (Tsuboi *et al.*, 1989; Jousson *et al.*, 2004), enzimas essenciais para os processos infectivos. Além disto, a glicose reprime a expressão de proteases extracelulares em dermatófitos (Meevootisom e Niederpruem, 1979; Apodaca e Mckerrow, 1989).

Quando analisamos os valores de pH dos cultivos da linhagem H6, em pH inicial 8,0, observamos, em 24 horas, um pequeno aumento em torno de 0,5 unidade de pH, tanto em queratina quanto em glicose mais glicina. Entretanto, em glicose foi observado uma leve diminuição de 0,5 unidade no pH. Os dados obtidos para queratina e glicose mais glicina, corroboram com a literatura, uma vez que o dermatófito *T. rubrum*, quando cultivado em meio com pH inicial alcalino (8,0 e 9,0), tem um crescimento restrito e o pH varia em menores proporções (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2003). A glicose por sua vez, tende a acidificação do meio reprimindo a expressão de proteases extracelulares de *T. rubrum* durante o cultivo (Maranhão *et al.*, 2007). Cultivos em meio sabouraud também apresentaram uma variação de pH de 5,7 para 7,4, como observado para meio mínimo com outras fontes de carbono.

Na linhagem *pacC-1*, o comportamento do pH em todos os cultivos permaneceu semelhante ao apresentado na linhagem H6, indicando que embora o gene *pacC* participe da regulação da atividade de enzimas queratinolíticas importantes para a virulência fúngica (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006), ele não está envolvido na alcalinização do meio de cultivo (Silveira *et al.*, 2010). Portanto, nestas condições a alcalinização deve ocorrer por vias metabólicas que não envolvam o complexo PacC/Pal.

2 Expressão dos genes *N*-man e *O*-man de *T. rubrum* em resposta a diferentes fontes nutricionais e pH extracelular

Em *N. crassa*, uma das respostas metabólicas em função do pH é a glicosilação de enzimas secretadas (Palma *et al.*, 1989). Por exemplo, a fosfatase alcalina Pi-repressível codificada pelo gene *pho-2* e sintetizada em pH alcalino difere da enzima sintetizada em pH ácido somente nos níveis de glicosilação, evidenciando a participação de glicosilações na resposta adaptativa ao pH (Nozawa *et al.*, 2002).

Em *A. nidulans* foi demonstrada a participação da proteína PalB nas modificações pós-traducionais (glicosilações) da fosfatase ácida Pi-repressível quando o fungo é cultivado em pH 5,0. Análises de expressão gênica diferencial entre as linhagens parental *pabaA1* e mutante *pabaA1 palB7*, cultivadas em glicose/pH 5,0/baixo fosfato, demonstraram drástica diminuição da expressão do gene que codifica para uma *O*-manosiltransferase e redução da expressão de NADH-Ubiquinona oxidoreductase, mostrando a influência do gene *palB* nessas condições experimentais (Nozawa *et al.*, 2003b).

Resultados recentes de nosso laboratório também demonstraram que, em meio complexo YEM (Yeast Extract Medium)/pH 5,0/baixo fosfato, a linhagem parental processa normalmente o pré-mRNA de *palB*, o mesmo não sendo observado em pH 8,0. Para estas mesmas condições na linhagem mutante, independente do pH, o processamento do pré-mRNA de *palB* não ocorre (Trevisan *et al.*, 2011). Esses estudos mostram que nessas condições, a linhagem parental YEM/pH 8,0 e a mutante apresentam o mesmo perfil de processamento do pré-mRNA de *palB*, sugerindo que este processamento diferencial possa interferir na expressão de *O*-manosiltransferase, como observado por Nozawa *et al.*, (2003b) na linhagem mutante *pabaA1 palB7*, cultivadas em glicose/pH 5,0/baixo fosfato.

Os resultados de análises da expressão de *O*-man na linhagem *pacC⁺* de *T. rubrum* cultivada em queratina/pH 5,0 não demonstraram variações significativas nos níveis de

expressão nos diferentes tempos, mas houve uma redução dos níveis de expressão dessa enzima em queratina/pH 8,0. Da mesma forma, a expressão de *O*-man na linhagem *pacC*⁻ foi reduzida nos cultivos tanto em pH 5,0 quanto em pH 8,0, corroborando os resultados de Ferreira-Nozawa *et al.*, (2006), já que a redução da atividade de enzimas queratinolíticas secretadas pode ser diretamente proporcional a redução de expressão de manosiltransferases.

Quando utilizada glicose como fonte de carbono/pH 5,0 ou 8,0, na linhagem *pacC*⁺ os níveis de expressão de *O*-man mantiveram-se semelhantes. Assim como observado para as condições de crescimento em queratina, houve uma redução dos níveis de expressão desse gene na linhagem *pacC*⁻.

O dermatófito modula o pH ambiente em função da fonte de carbono utilizada, aumentando o pH extracelular em meios suplementados com glicina e glicose ou queratina. Sendo a metabolização glicina um agente de alcalinização do meio em ambas as situações, pode-se sugerir uma relação entre a metabolização de aminoácidos simples, como a glicina, e o aumento da expressão de enzimas envolvidas na glicosilação, como a *O*-man. Em pH 5,0 pode-se observar na linhagem *pacC*⁻ a elevação da expressão gênica da *O*-man em todos os tempos, a qual se mantém constante em todo o cultivo, sugerindo uma modulação negativa pelo gene *pacC* nestas condições. Já em pH 8,0 verificamos diminuição da expressão quando comparamos com a linhagem *pacC*⁺, indicando que nesta condição experimental ocorre a regulação positiva pelo gene *pacC*.

Aparentemente, no cultivo de *T. rubrum* em glicina e glicose como fonte de carbono, o gene *pacC* modula a expressão da *O*-man de acordo com o pH do meio. Este fenômeno deve ser melhor avaliado para o entendimento da resposta do fungo perante a associação de fontes nutricionais simples como glicose, e aminoácidos como glicina, visto que este microrganismo é capaz de sensoriar e coordenar vias de transdução de sinais requisitadas durante a permanência no hospedeiro. A sobrevivência deste patógeno nestas condições associadas à glicina pode sugerir possíveis genes expressos durante o processo infeccioso.

Os dados de expressão gênica da *N*-man demonstram o efeito do fator de transcrição PacC sobre este gene em pH 5,0, já que na linhagem *pacC*⁺ este gene é menos expresso em queratina como fonte de carbono, comparado ao valor de expressão obtido para a linhagem mutante *pacC-1*. Ao analisarmos os resultados da expressão da *N*-man em pH inicial 8,0, verificamos um perfil de expressão similar ao obtido para *O*-man na condição de cultivo em queratina, mas com variações nas demais fontes de carbono. Esses dados sugerem que a expressão deste gene é dependente da fonte de carbono utilizada para o cultivo. Em outros organismos, como *A. niger* e *S. cerevisiae*, foi constatado que a produção e regulação de

glicoproteínas pode sofrer influência da fonte de carbono utilizada. A glicosilação também pode sofrer influência das fontes nutricionais utilizadas no cultivo (Dey *et al.*, 1994; Fu *et al.*, 1995).

Entretanto, a relação entre estas transferases parece ir além de uma regulação nutricional e por pH, já que estudos relatam que a *N*-glicosilação pode competir com a *O*-glicosilação, sendo que a *O*-manosilação não só precede como pode controlar os processos de *N*-glicosilação (Ecker *et al.*, 2003). Sendo assim, no cultivo em queratina/pH5,0, poderia sugerir que o gene *O*-man regula a expressão do gene *N*-man, já que na linhagem *pacC*/pH5,0, a regulação destas enzimas é nitidamente invertida, ou seja, a expressão de *O*-manosiltransferase aumenta na presença de glicina e reduzida em queratina, a expressão de *N*-manosiltransferase é menor em glicina e maior em queratina.

Estudos anteriores relatam que na linhagem *pacC-1* de *T. rubrum* a atividade queratinolítica diminui quando o fungo é cultivado em queratina, sugerindo que essas proteases são reguladas de alguma forma pelo gene *pacC* (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006). Os genes analisados neste trabalho não possuem a região consenso 5'-GCCAR(A/G)G-3' sugerindo uma regulação indireta pelo gene *pacC* com relação aos genes analisados em cultivo utilizando queratina como fonte de carbono. Isto indica que *pacC* pode atuar de forma importante no sensoriamento nutricional, induzindo ou reprimindo genes essenciais para captação de nutrientes e degradação da queratina do hospedeiro, tendo assim um papel importante na patogenicidade, uma vez que é em pH inicial ácido que o fungo inicia o processo infeccioso.

Nahas *et al.*, (1982), demonstraram em *N. crassa* que os níveis de produção da fosfatase (que é uma glicoproteína) são influenciados pela fonte nutricional e que quando o fungo é cultivado na mesma fonte de carbono a secreção desta enzima é dependente do pH do meio de cultivo. Estes resultados corroboram nossos dados uma vez que, quando usadas as mesmas fontes nutricionais, a expressão dos genes que codificam enzimas de glicosilação não apresenta o mesmo padrão quando o pH de cultivo é alterado.

Pode-se sugerir então que estes genes sejam responsivos a fonte de carbono, uma vez que quando o cultivo é efetuado em nutrientes distintos se expressam de forma diferente, e também ao pH inicial de cultivo, uma vez que quando cultivados na mesma fonte de carbono respondem diferentemente no pH ácido e alcalino. Pode-se sugerir também que em condições de baixo pH o gene *pacC* regula a atividade destas transferases de acordo com a fonte de carbono utilizada, mostrando seu papel no pH ácido e provavelmente no processo infeccioso deste dermatófito. Além disso, também está comprovada a importância das enzimas de

glicosilação na virulência e patogenicidade fungica, uma vez que as glicoproteínas ricas em manose são essenciais para o processo de adesão, como demonstrado em *C. albicans*. A adesão e outros fatores que induzem a resposta inata no hospedeiro estão associados à presença de mananas. Estas glicoproteínas de parede celular são responsáveis pelo reconhecimento do patógeno pelo sistema imunológico, induzindo assim a resposta inata do hospedeiro (Mora-Montes *et al.*, 2010; Chirag *et al.*, 2011). Em *T. rubrum* também foi demonstrado que ocorre a expressão de glicoproteínas que reconhecem e se ligam a resíduos de manose e galactose na superfície celular de mamíferos (Esquenazi *et al.*, 2004). Sendo assim, nossos resultados são atraentes para futuros estudos sobre a relação patógeno-hospedeiro e até mesmo para o entendimento da biologia do fungo até então pouco conhecidas, o que se torna um assunto nascente para a compreensão dos mecanismos de virulência e patogenicidade de *T. rubrum* e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Conclusão

VII CONCLUSÃO

O presente trabalho contribuiu para avançar no entendimento dos eventos moleculares envolvidos na regulação transcricional de manosiltransferases no dermatófito *T. rubrum*. A partir dos resultados apresentados concluímos que:

- ✓ O perfil de expressão dos dois genes analisados mostra regulação pela fonte nutricional associada ao pH extracelular. Os genes que codificam para *O*- e *N*-manosiltransferases, quando *T. rubrum* é cultivado em queratina e pH ácido, apresentaram um perfil de expressão diferenciado, sendo *O*-man expressa preferencialmente em pH ácido;
- ✓ O balanço da expressão de *O*-man e *N*-man é regulado pelo fator de transcrição PacC em queratina e pH ácido. Portanto, o gene *pacC* tem um importante papel no sensoriamento de nutrientes e regulação de enzimas queratinolíticas, influenciando a patogenicidade fúngica e confirmando a funcionalidade do gene *pacC* em pH ácido;
- ✓ A regulação molecular pelo gene *pacC*, sugere que os genes *O*-man e *N*-man são provavelmente requisitados em níveis diferentes, de acordo com o estágio do processo infeccioso. Isto reforça a importância da glicosilação protéica na interação patógeno-hospedeiro, tendo papel essencial na adesão às células e também ativação de enzimas queratinolíticas que vão captar nutriente para o desenvolvimento e manutenção do organismo no hospedeiro.

Perspectivas

VIII PERSPECTIVAS

Este trabalho abre novas perspectivas para a elucidação dos processos metabólicos e celulares envolvidos na adaptabilidade de *T. rubrum* em resposta ao pH e à fonte nutricional disponível no micro-ambiente hospedeiro, como por exemplo:

- ✓ Avaliar o perfil de expressão dos genes que codificam para as *O*- e *N*-manosiltransferases em diferentes tempos de cultivo.
- ✓ Avaliar os níveis de glicosilação, composição de monossacarídeos e a atividade das queratinases, correlacionando com a funcionalidade das mesmas;
- ✓ Realizar estudos funcionais de manosiltransferases, utilizando a metodologia *ex-vivo* (pele e unha), de modo a observar os níveis de expressão destas moléculas no micro-ambiente hospedeiro.
- ✓ Avaliar os níveis de expressão do gene *palB* e processamento do seu respectivo RNA, correlacionando a expressão gênica com o observado para as manosiltransferases, enfatizando a relação destes genes com o fator de transcrição PacC nas condições utilizadas neste estudo.

Referências Bibliográficas

IX REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D. J. Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v.25, p.3389-402. 1997.

APODACA, G. e MCKERROW, J. H. Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. **Infect Immun**, v.57, p.3081-90. 1989.

ARST, H. N. Jr., PENALVA, M. A. pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. **Trends in Genetics**, v.19, p.224-231. 2003.

ATLAS, R. M. **Handbook of microbiological media**: CRC Press. 1993. 786 p. (Perks, L. C.)

CADDICK, M. X., BROWNLEE, A. G., ARST, H. N. Regulation of gene-expression by pH of the growth-medium in *Aspergillus nidulans*. **Mol Gen Genet**, v.203, p.346-353. 1986.

CHIRAG, C. S., HALL, R., LEWIS, L., BROWN, A. J. P., ODDS, F. C.. Glycosilation status of the *C. albicans* cell wall affects the efficiency of neutrophil phagocytosis and klling but not cytokine signaling. **Med Mycol**, v.49, p.513-524. 2011.

COVE, D. J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochim Biophys Acta**, v.113, p.51-6. 1966.

CROCKER, P. R., FEIZI, T. Carbohydrate recognition systems: functional triads in cell-cell interactions. **Curr Opin Struct Biol**, v. 6, p.679-691. 1996.

DENISON, S. H., NEGRETE-URTASUN, S., MINGOT, J. R., TILBURN, J., MAYER, W. A., GOEL, A., ESPESO, E. A., PENALVA, M. A., ARST, H. N. Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous. **Mol Microbiol**, v.30, p.259-264. 1998.

DESHPANDE, N., WILKINS, M. R., PACKER, N., NEVALAINEN, H. Protein glycosilation pathways in filamentous fungi. **Glycobiology**, v.18, p.626-637. 2008.

DEY, N. B., BOUNELIS, P., FRITZ, T. A., BEDWELL, D. M., MARCHASE, R. B. The glycosilation of phophomutase is modulated by carbon source and heat shock in *Sacharomyces cerevisiae*. **Journal Biol Chem**, v.269, p.27143-27148 1994.

- DORN, G. Phosphatase mutants in *Aspergillus nidulans*. **Science**, v.150, p.1183-1184. 1965.
- ECKER, M., MRSA, V., HAGEN, I., DEUTZMANN, R., STRAHL, S., TANNER, W. O-mannosylation precedes and potentially controls the N-glycosylation of yeast cell wall glycoprotein. **EMBO J**, v.4, p.628-632 2003.
- ELLIS, D., MARRIOTT, D., HAJJEH, R. A., WARNOCK, D., MEYER W., BARTON, R. Epidemiology: surveillance of fungal infections. **Med Mycol**, v.38 Suppl 1, p.173-82. 2000.
- ESQUENAZI, D., ALVIANO, C. S., De SOUZA, W., ROZENTAL, S.. The influence of surface carbohydrates during in vitro infection of mammalian cells by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Res Microbiol**, v.155, p.144-53. 2004.
- EWING, B., GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res**, v.8, p.186-94. 1998.
- FERREIRA-NOZAWA, M. S., NOZAWA, S. R., MARTINEZ-ROSSI, N. M., ROSSI, A. The dermatophyte *Trichophyton rubrum* secretes an EDTA-sensitive alkaline phosphatase on high-phosphate medium. **Braz J Microbiol**, v.34, p.161-164. 2003.
- FERREIRA-NOZAWA, M. S., SILVEIRA, H. C. S., ONO, C. J., FACHIN, A. L., ROSSI, A., MARTINEZ-ROSSI, N. M.. The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail *in vitro*. **Med Mycol**, v.44, p.641-5. 2006.
- FREITAS, J. S., SILVA, E. M., LEAL, J., GRAS, D. E., MARTINEZ-ROSSI, N. M., SANTOS, L. D., PALMA, M. S., ROSSI, A. Transcription of the Hsp30, Hsp70, and Hsp90 heat shock protein genes is modulated by the PalA protein in response to acid pH-sensing in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Cell Stress Chaperones**, v.16, p.565-72. 2011.
- FREITAS, J. S., SILVA, E. M., ROSSI, A. Identification of nutrient-dependent changes in extracellular pH and acid phosphatase secretion in *Aspergillus nidulans*. **Genet Mol Res**, v.6, p.721-9. 2007.
- FU, L., BOUNELIS, P., DEY, N., BORWNE, B. L., MARCHASE, R. B., BEDWELL. D. M. The posttranslational modification of phosphoglucomutase is regulated by galactose induction and glucose repression in *Sacharomyces cerevisiae*. **Journal Bacteriol**, v.177, p.3087-3094. 1995.

GEMMILL, T. R. e TRIMBLE, R. B. Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. **Biochim Biophys Acta**, v.1426, p.227-237. 1999.

GENTZSCH, M., TANNER, W. The PMT gene family: protein O-glycosilation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. **Embo J**, v.15, p.5752-5759. 1996.

GOTO, M. Protein O-glycosylation in fungi: diverse structures and multiple functions. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.71, p.1415-1427. 2007.

HAN, S. W., MICHELIN, M. A., BARBOSA, J. E., ROSSI, A. Purification and constitutive excretion of acid-phosphatase in *Neurospora crassa*. **Phytochemistry**, v.35, p.1131-1135. 1994.

HUANG, X., MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res**, v.9, p.868-77. 1999.

ITO, T., CHIBA, T., OZAWA, R., YOSHIDA, M., HATTORI, M., SAKAKI, Y. A comprehensive twohybrid analysis to explore the yeast protein interactome. **Proc Natl Acad Sci** v.98, p.4569-4574. 2001.

JOUSSON, O., LECHENNE, B., BONTEMS, O., MIGNON, B., REICHARD, U., BARBLAN, J., QUADRONI, M., MONOD, M. Secreted subtilisin gene family in *Trichophyton rubrum*. **Gene**, v.339, p.79-88. 2004.

KAINZ, E., GALLMETZER, A., HATZL, C., NETT, J. H., LI, H., SCHINKO, T., PACHLINGER, R., BERGER, H., REYES-DOMINGUEZ, Y., BERNREITER, A., GERNGROSS, T., WILDT, S., STRAUSS, J. N-glycan modification in *Aspergillus* species. **Appl Environ Microbiol**, v.74, p.1076-1086. 2008.

KAUFMAN, G., HORWITZ, B. A., DUEK, L., ULLMAN, Y., BERDICEVSKY, I. Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: microscopic characterization and proteolytic enzymes. **Med Mycol**, v.45, p.149-55. 2007.

KERN, M. E., BLEVINS, K. S. Dermatofitos. In: Premier (Ed.). **Micologia Médica**. Rio de Janeiro, 2004. Dermatofitos, p.117-120

KONEMAN, E. W., DOWELL, V. R. Dermatofitoses. In: Medsi (Ed.). **Diagnóstico microbiológico**. Rio de Janeiro, 2001. Dermatofitoses, p.1032-1035

KRIANGKRIPIPAT, T., MOMANY M. *Aspergillus nidulus* protein O-manosiltransferases play roles in cell wall integrity and developmental patterning. **Eucariot Cell**, v.8, p.1475-1485. 2009.

KUKURUZINSKA, M. A. Protein N-glycosylation: Molecular genetics and functional significance. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.9, p.415-448. 2001.

LENGELER, K. B., TIELKER, D., ERNST, J. F. Protein O-mannosyltransferases in virulence and development. **Cell Mol Life Sci**, v.65, p.528-544. 2008.

LOMMEL, M., STRAHL, S. Protein O- manosylation: Conserved from bacteria to humans. **Glycobiology**, v.19, p.816-828. 2009.

MACCHERONI Jr., W., MARTINEZ-ROSSI, N. M., ROSSI, A. Does gene *palB* regulate the transcription or the post-translational modification of Pi-repressible phosphatases of *Aspergillus nidulans*? **Brazilian J Med Biol Res**, v.28, p.31-8. 1995.

MANSOUR, S., BECKERICH, J. M., BONNARME, P. Lactate and amino acid catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*. **Appl Environ Microbiol**, v.74, p.6505-6512. 2008.

MARANHÃO, F. C. A., PAIÃO, F. G., MARTINEZ-ROSSI, N. M. Isolation of transcripts over-expressed in human pathogen *Trichophyton rubrum* during growth in keratin. **Microb Pathog**, v.43, p.166-72. 2007.

MARTINEZ-ROSSI, N. M., FERREIRA-NOZAWA, M. S., GRAMINHA, M. A. S., NOZAWA, S. R., FACHIN, A. L., CERVELATTI, E. P., PRADE, R. A., ROSSI, A. Molecular aspects of dermatophyte-host interactions. In: R. K. S. Kushwaha (Ed.). **Fungi in human and animal health**. Jodhpur, India: Scientific Publishers, v.9, 2004. Molecular aspects of dermatophyte-host interactions, p.143-165

MEEVOOTISOM, V., NIEDERPRUEM, D. J. Control of exocellular proteases in dermatophytes and especially *Trichophyton rubrum*. **Sabouraudia**, v.17, p.91-106. 1979.

MORA-MONTES, H. M., BATES, S., NETEA, M. G., CASTILLO, L., BRAND, A., BUURMAN, E. T., DÍAZ-JIMENEZ, D. F., KULLBERG, B. J., BROWN, A. J., ODDS, F. C., GOW, N. A. A multifunctional mannosyltransferase family in *Candida albicans* determines cell wall mannan structure and host-fungus interaction. **Journal Biol Chem**, v.285, p.12087-12095. 2010.

MUNRO, G. What can yeast us about n-linked glycosylation in the Golgi apparatus? **FEBS** v.498, p.223-227. 2001.

NAHAS, E., TERENCE, H. F., ROSSI, A. Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid-phosphatase (EC3.1.3.2) and alkaline-phosphatase (EC3.1.3.1) in *Neurospora crassa*. **J Gen Microbiol**, v.128, p.2017-2021. 1982.

NEGRETE-URTASUN, S., REITER, W., DIEZ, E., DENISON, S. H., TILBURN, J., ESPESO, E. A., PEÑALVA, M. A., ARST, H. N. Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene characterization. **Mol Microbiol**, v.33, p.994-1003. 1999.

NOZAWA, S. R., FERREIRA-NOZAWA, M. S., MARTINEZ-ROSSI, N. M., ROSSI, A. The pH-induced glycosylation of secreted phosphatases is mediated in *Aspergillus nidulans* by the regulatory gene *pacC*-dependent pathway. **Fungal Genet Biol**, v.39, p.286-295. 2003a.

NOZAWA, S. R., MACCHERONI, W. Jr., STABELI, R. G., THEDEI, G. Jr., ROSSI, A. Purification and properties of pi-repressible acid phosphatases from *Aspergillus nidulans*. **Phytochemistry**, v.49, p.1517-1523. 1998.

NOZAWA, S. R., MAY, G. S., MARTINEZ-ROSSI, N. M., FERREIRA-NOZAWA, M. S., COUTINHO-NETTO, J., MACCHERONI, W. Jr., ROSSI, A. Mutation in a calpain-like protease affects the posttranslational mannosylation of phosphatases in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet Biol**, v.38, p.220-7. 2003b.

NOZAWA, S. R., THEDEI, G., CROTT, L. S. P., BARBOSA, J. E., ROSSI, A. The synthesis of phosphate-repressible alkaline phosphatase does not appear to be regulated by ambient pH in the filamentous mould *Neurospora crassa*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.92-95. 2002.

OREJAS, M., ESPESO, E. A., TILBURN, J., SARKAR, S., ARST, H. N., PEÑALVA, M. A. Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. **Genes Dev**, v.9, p.1622-1632. 1995.

PALMA, M. S., HAN, S. W., ROSSI, A. Dissociation and Catalytic Activity of Phosphate-Repressible Alkaline-Phosphatase from *Neurospora crassa*. **Phytochemistry**, v.28, p.3281-3284. 1989.

PARODI, A. J. Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. **Biochem. J.**, v.348, p.1-13. 2000.

PELEG, Y., METZENBERG, R. L. Analysis of the DNA-binding and dimerization activities of *Neurospora crassa* transcription factor NUC-1. **Mol Cell Biol**, v.14, p.7816-26. 1994.

PEÑAS, M. M., HERVAS-AGUILAR, A., MUNERA-HUERTAS, T., REOYO, E., PENALVA, M. A., ARST, H. N. Jr., TILBURN, J. Further characterization of the signaling proteolysis step in the *Aspergillus nidulans* pH signal transduction pathway. **Eukaryot Cell**, v.6, p.960-70. 2007.

PERES, N. T., MARANHÃO, F. C., ROSSI, A., MARTINEZ-ROSSI, N. M. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. **An Bras Dermatol**, v.85, p.657-67. 2010.

ROCHA, S. N. **Excreção e produção de proteínas heterólogas do gênero *Kluyveromyces marxianus* tese** (doutorado engenharia química), Universidade de São Paulo, São Paulo 2010.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989

SCHEFE, J. H., LEHMANN, K. E., BUSCHMANN, I. R., UNGER, T., FUNKE-KAISER, H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. **Journal of Molecular Medicine**, v.84, p.901-910. 2006.

SEEBACHER, C., BOUCHARA, J. P., MIGNON, B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. **Mycopathologia**, v.166, p.335-52. 2008.

SILVA, E. M., FREITAS, J. S., GRAS, D. E., SQUINA, F. M., LEAL, J., SILVEIRA, H. C. S., MARTINEZ-ROSSI, N. M., ROSSI, A. Identification of genes differentially expressed in a strain of the mold *Aspergillus nidulans* carrying a loss-of-function mutation in the *pala* gene. **Can J Microbiol**, v.54, p.803-11. 2008.

SILVEIRA, H. C. S., GRAS, D. E., CAZZANIGA, R. A., SANCHES, P. R., ROSSI, A., MARTINEZ-ROSSI, N. M. Transcriptional profiling reveals genes in the human pathogen *Trichophyton rubrum* that are expressed in response to pH signaling. **Microb Pathog**, v.48, p.91-96. 2010.

THEDEI Jr., G., DOUBOWETZ, T. H., ROSSI, A. Effect of carbon source and extracellular pH on the acidification of the culture medium and phosphatase excretion in *Neurospora crassa*. **Braz J Med Biol Res**, v.27, p.1129-34. 1994.

TILBURN, J., SARKAR, S., WIDDICK, D. A., ESPESO, E. A., OREJAS, M., MUNGROO, J., PEÑALVA, M. A., ARST, Jr. H. N. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. **EMBO J**, v.14, p.779-90. 1995.

TREVISAN, G. L., OLIVEIRA, E. D., PERES, N. T. A., CRUZ, A. H. S. Transcription of *Aspergillus nidulans pacC* is modulated by alternative splicing of *palB*. **FEBS**. 2011. In press.

TSUBOI, R., Ko, I. J., TAKAMORI, K., OGAWA, H. Isolation of a keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. **Infect Immun**, v.57, p.3479-3483. 1989.

VERMOUT, S., TABART, J., BALDO, A., MATHY, A., LOSSON, B., MIGNON, B. Pathogenesis of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v.166, p.267-75. 2008.

VINCENT, O., RAINBOW, L., TILBURN, J., ARST, H. N., PEÑALVA, M. A. YPXL/I is a protein interaction motif recognized by *Aspergillus* PalA and its human homologue, AIP1/Alix. **Mol Cell Biol**, v.23, p.1647-1655. 2003.

WEITZMAN, I., SUMMERBELL, R. C. The Dermatophytes. **Clin Microbiol Rev**, v.8, p.240-259. 1995.

WILLER, T., BRANDL, M., SIPICZKI, M., STRAHL, S. Protein o-mannosylation is crucial for cell wall integrity, septation and viability in fission yeast. **Mol Microbiol**, v.57, p.156-170. 2005.

WU, D., DOU, X., HASHMI, S. B., OSMANI, S. A. The Pho80-like cyclin of *Aspergillus nidulans* regulates development independently of its role in phosphate acquisition. **J Biol Chem**, v.279, p.37693-703. 2004.

XU, W., MITCHELL, A. P. Yeast PalA/AIP1/Alix homolog Rim20p associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage. **Journal Bacteriol**, v.183, p.6917 - 6923. 2001.