Universidade de São Paulo
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

César Moisés Camilo

Regulação da expressão gênica por oxigênio no fungo
aquático *Blastocladiella emersonii*

São Paulo

Data do Depósito na SPG
13/11/2009

César Moisés Camilo

**Regulação da expressão gênica por oxigênio no fungo
aquático *Blastocladiella emersonii***

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título de
Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientadora: Prof^a Dr^a Suely Lopes Gomes

São Paulo

2009

César Moisés Camilo

Regulação da expressão gênica por oxigênio no fungo aquático *Blastocladiella emersonii*

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título de
Doutor em Ciências (Bioquímica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

PRÓLOGO

Por absoluto acaso, mas por ironia dele, neste ano de 2009 comemoramos os 200 anos do nascimento de Charles Robert Darwin e os 150 anos da publicação de sua mais bela obra “A Origem das Espécies”. Não quero sugerir nenhum significado cabalístico para esta data, mas fica impossível não reverenciar este que é um dos maiores pensadores que já existiram. Darwin, por meio da teoria da seleção natural, conseguiu dar uma explicação elegante e absolutamente bela a uma das questões mais intrigantes da humanidade: “De onde viemos?”. Sua teoria mudou para sempre nossa visão em relação ao mundo e nosso lugar nele, além de lançar as bases da biologia moderna, juntamente com as descobertas posteriores sobre a transmissão hereditária das características dos seres, por meio dos genes. A genialidade de Darwin não está somente em sua descoberta sobre a complexidade e diversidade da vida, mas na simplicidade de sua explicação e nas evidências gritantes que ele encontrou em sua viagem a bordo do HMS Beagle. Tanto foi genial sua teoria, que conseguiu se perpetuar em uma época em que os mitos religiosos de criação divina tinham extrema influência, até mesmo no meio científico. Darwin iluminou o mundo provando que não somos seres perfeitos criados por entidades sobrenaturais. Na verdade, somos seres vencedores que graças à adaptação de nossos antepassados mais distantes, gozamos de um momento único e fantasticamente supremo – a vida.

"Eu estou quase convencido de que (completamente contrário à opinião de quando comecei) as espécies não são (e isso é tal como uma confissão de um assassinato) imutáveis."

Charles Darwin, 1844

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Suely Lopes Gomes, por confiar no meu trabalho e me proporcionar todas as condições para desenvolver minha pesquisa. Sua seriedade e zelo com que trata o patrimônio público é algo que deveria ser copiado e que levarei comigo para sempre.

Ao Prof. Dr. Hamza El-Dorry e todos os amigos de seu antigo laboratório, Wilton, Zilda, Marluce, Erik, Augusto, Eric, Ari e Inês.

Ao Prof. Dr. Felipe Chambergo pela amizade, parceria e discussões durante todo meu doutorado e iniciação científica.

À CAPES, CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro.

Aos amigos do laboratório André Vieira, Rogério Lourenço, Gabriela Mol, Raphaela Georg, Karina Ribichich, Michelle Suzin, Christian Kohler, Anne Krause, Ricardo Vêncio, Tie Koide, Luci Navarro, Sandra Mara e Ivone Pereira, pela amizade, trabalho em equipe e ajudas imprescindíveis para a realização desse trabalho.

À Prof^a. Dra. Regina Baldini e seus alunos Ana Laura, Eliezer, Diogo, Gianluca, Ana Paula, Patrícia e Gilberto, por tornarem a rotina no laboratório sempre agradável.

À Denise Yamamoto, pelo apoio técnico durante os experimentos de microarranjo e pelas divertidas conversas.

Aos colegas da Secretaria de Pós-Graduação pela ajuda e agilidade.

Ao Prof. Dr. Etelvino Bechara, ao Prof. Dr. Nilson Assunção e suas alunas de iniciação científica Adriana, Cecília e Ana, pela realização das análises metabolômicas por Eletroforese Capilar.

Aos meus amigos da Rep. Pasquote e da Rep. Pablito: Otávio, Jairo, Pedro, Diego e Gordz, por tudo aquilo que não diz respeito a trabalho na vida acadêmica.

Aos meus amigões do peito João, Rita, Rafa, Rê, Careca, Ligera, Regina, Northon, Bruno, Lucas, Gui, Heid, Flaviana, Flavinha, Tabata e Talissa, pela valiosa e sincera amizade de sempre.

À Fabiana, que me fez superar todos os momentos difíceis deste trabalho e por ser uma pessoa tão maravilhosa com quem tenho o prazer de compartilhar minha vida. E é claro a toda sua família, Mariângela, Sérgio, Marina e Renata, que sempre me apoiaram em tudo.

Aos meus irmãos Thales e Luciana, companheiros de todas as horas.

Aos meus pais, Ciro e Beth, meus agradecimentos vão muito além desta tese. Toda uma vida de exemplos, dedicação e ensinamentos é prova de verdadeiro amor incondicional que me faz um imenso nó na garganta. Além de matarem um leão por dia para que eu e meus irmãos pudéssemos estudar, fizeram de nossa casa um ambiente de inúmeros estímulos à cultura, ao esporte e à ciência, sem os quais dificilmente estaria defendendo uma tese de doutorado.

É com imensa gratidão que dedico esta tese aos meus pais.

RESUMO

Camilo, C.M. Regulação da expressão gênica por oxigênio no fungo aquático *Blastocladiella emersonii*. 2009. 140 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Neste trabalho realizamos a análise das variações na expressão gênica global do fungo aquático *Blastocladiella emersonii* submetido ao estresse de carência de oxigênio (hipóxia), utilizando a técnica de microarranjos de cDNA em lâminas contendo 3773 genes distintos. Nos experimentos de hipóxia gradual (diminuição gradual da concentração de oxigênio dissolvido, seguido de reoxigenação) e hipóxia direta (diminuição direta da concentração de oxigênio dissolvido, seguido de reoxigenação) observamos que 650 genes foram diferencialmente expressos em pelo menos uma das condições de estresse e que 534 deles mostraram-se afetados (direta ou indiretamente) pela disponibilidade de oxigênio, uma vez que apresentaram recuperação (ou tendência à recuperação) da sua expressão aos níveis normais, quando as células foram reoxigenadas. Além de modular a expressão de diversos genes sem função conhecida, *B. emersonii* responde à hipóxia reajustando a expressão de genes responsáveis pela produção e consumo de energia. Pelo menos transcricionalmente, este fungo favorece o metabolismo anaeróbico, através da indução de genes que codificam enzimas da via glicolítica e lactato desidrogenase, ao passo que no ciclo do ácido cítrico, a maioria dos genes encontram-se reprimidos ou não sofrem alteração na expressão. Processos dispendiosos em energia como síntese protéica, metabolismo de aminoácidos, enovelamento de proteínas e transporte por membrana apresentaram perfis predominantemente de repressão gênica quando em carência de oxigênio. Ainda utilizando a técnica de microarranjos, mostramos semelhanças entre os perfis transcricionais nos experimentos hipóxia e de carência de Fe^{2+} (tratamento com quelante de Fe^{2+} 2,2'-dipyridyl) sugerem que estes estresses estão de alguma forma relacionados, fornecendo bons indícios de que o íon Fe^{2+} possa ter um papel importante no mecanismo sensor de oxigênio e/ou de resposta a hipóxia em *B. emersonii*. Além disso, o tratamento prévio de células submetidas à hipóxia com o antibiótico geldanamicina, um conhecido inibidor da proteína de choque térmico HSP90, levou à diminuição da indução de certos genes de hipóxia, indicando que este fungo pode possuir algum mecanismo semelhante ao do fator de transcrição de hipóxia HIF1- α de mamíferos, uma vez que este fator também é afetado por geldanamicina. Adicionalmente, desenvolvemos um protocolo para transformação de *B. emersonii* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* que se mostrou promissor. A transferência do T-DNA contendo um gene de resistência a higromicina B, presente no vetor binário pBINPLUS-Hph, foi evidenciada pelo crescimento normal e esporulação das células transformadas, na presença do antibiótico e pela amplificação do gene de resistência no DNA genômico de células transformadas.

Palavras-chave: fungo aquático, microarranjos de cDNA, hipóxia, expressão gênica

ABSTRACT

Camilo, C.M. Regulation of gene expression by oxygen in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. 2009. 140 p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In this work we analyzed global gene expression changes in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* submitted to oxygen deprivation (hypoxia), using cDNA microarrays containing 3,773 distinct genes. In gradual hypoxia (gradual decrease in dissolved oxygen concentration, followed by reoxygenation) and direct hypoxia (direct decrease of dissolved oxygen concentration, followed by reoxygenation) we observed 650 differentially expressed genes in at least one of the stress conditions tested, 534 of them being affected (directly or indirectly) by oxygen availability, since they showed recovery of normal expression levels or a tendency to recover, when cells were reoxygenated. Besides modulating many genes with no previously assigned function, *B. emersonii* responds to hypoxia by readjusting the expression levels of genes responsible for energy production and consumption. At least transcriptionally, this fungus seems to favour anaerobic metabolism through the induction of genes encoding glycolytic enzymes and lactate dehydrogenase, while in the TCA-cycle, most genes were repressed or unchanged. Energy-costly processes like protein synthesis, amino acid metabolism, protein folding and transport had their gene expression profiles predominantly repressed during oxygen deprivation. Microarray experiments also showed similarities between the transcriptional profile of genes in hypoxia and iron (II) deprivation (treatment with the iron (II) chelator 2,2'-dipyridyl), suggesting that these stresses are somehow related, giving good evidence that Fe^{2+} ion could have a role in the mechanism of oxygen sensing and/or response to hypoxia in *B. emersonii*. Furthermore, pretreatment of cells subjected to hypoxia with the antibiotic geldanamycin, a known inhibitor of the heat shock protein HSP90, caused a significant decrease in the induction of certain hypoxic genes, indicating that this fungus could have a mechanism similar to that of the mammalian hypoxia transcription factor HIF-1 α , which is also affected by geldanamycin. Additionally, we developed an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated protocol for transformation of *B. emersonii* that has shown to be promising. The capacity to transfer the T-DNA containing a hygromycin B resistance gene, present in the pBINPLUS-Hph binary vector, was evidenced by the normal growth and sporulation of the transformed cells in the presence of antibiotic and by amplification of the resistance gene from the genomic DNA of transformed cells.

Keywords: aquatic fungus, cDNA microarray, hypoxia, gene expression

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	III
LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES	III
ABREVIATURAS E SIGLAS	IV
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 ASPECTOS EVOLUTIVOS NAS VIAS DE PRODUÇÃO DE ATP	6
2.2 RESPOSTAS A CARÊNCIA DE OXIGÊNIO	7
2.3 O MODELO DE ESTUDO: <i>BLASTOCLADIELLA EMERSONII</i>	12
2.4 ESTUDOS METABOLÔMICOS UTILIZANDO A TÉCNICA DE ELETROFORESE CAPILAR	17
2.5 TRANSFORMAÇÃO DE EUCARIOTOS MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM TUMEFASCIENS</i>	19
3 OBJETIVOS	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 CULTIVO DE <i>BLASTOCLADIELLA EMERSONII</i>	23
4.2 MEIOS DE CULTURA	23
4.3 LINHAGENS BACTERIANAS	24
4.4 TÉCNICAS GERAIS DE BIOLOGIA MOLECULAR	24
4.5 CULTIVO DE <i>B. EMERSONII</i> EM BIORREATOR	24
4.6 EXPERIMENTOS DE HIPÓXIA GRADUAL (HG)	25
4.7 QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE E LACTATO EXTRACELULAR	26
4.8 EXPERIMENTOS DE HIPÓXIA DIRETA (HD)	27
4.9 EXPERIMENTO DE CARÊNCIA DE FERRO	28
4.10 EXPERIMENTO DE HIPÓXIA COM GELDANAMICINA	29
4.11 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE <i>B. EMERSONII</i>	29
4.12 MICROARRANJOS DE cDNA	30
4.12.1 Síntese de cDNA e marcação com fluoróforo para hibridização dos microarranjos	30

4.12.2	<i>Hibridização e leitura da fluorescência das lâminas de microarranjos.....</i>	31
4.12.3	<i>Quantificação da fluorescência emitida nos microarranjos e extração dos dados</i>	33
4.12.4	<i>Normalização dos dados de Microarranjo.....</i>	34
4.12.5	<i>Determinação dos genes diferencialmente expressos.....</i>	34
4.12.6	<i>Agrupamento dos genes diferencialmente expressos segundo o perfil de expressão.....</i>	37
4.12.7	<i>Determinação das categorias do Consórcio Gene Ontology mais representadas entre os genes diferencialmente expressos</i>	38
4.12.8	<i>Depósito dos dados de microarranjo</i>	39
4.13	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR QUANTITATIVO	39
4.14	ANÁLISE DE METABÓLITOS POR ELETROFORESE CAPILAR.....	41
4.14.1	<i>Princípio do método.....</i>	41
4.14.2	<i>Análise de metabólitos catiônicos por CE-MS.....</i>	41
4.14.3	<i>Preparação dos extratos metabólicos</i>	42
4.14.4	<i>Quantificação de proteínas totais – Método Bradford.....</i>	43
4.15	TRANSFORMAÇÃO DE <i>B. EMERSONII</i> POR <i>AGROBACTERIUM TUMEFASCIENS</i>	43
4.15.1	<i>Construção do Vetor Binário pBINPLUS-Hph</i>	43
4.15.2	<i>Protocolo de transformação</i>	44
4.15.3	<i>Extração rápida de DNA genômico de zoósporos</i>	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	CARÊNCIA DE OXIGÊNIO: HIPÓXIA GRADUAL E DIRETA.....	48
5.1.1	<i>Aspectos morfológicos.....</i>	48
5.1.2	<i>Captação de glicose.....</i>	49
5.1.3	<i>Genes diferencialmente expressos</i>	51
5.1.4	<i>Agrupamento dos genes diferencialmente expressos segundo os perfis de expressão</i>	52
5.1.5	<i>Determinação das categorias do Consórcio Gene Ontology (GO) mais representadas entre os genes diferencialmente expressos em hipóxia.....</i>	54
5.1.6	<i>Análise da expressão de genes ausentes nos microarranjos por qRT-PCR</i>	56
5.1.7	<i>Análise dos genes afetados pela concentração de oxigênio dissolvido.....</i>	58

5.1.8	<i>Comparação da resposta transcricional de B. emersonii com a de outros fungos</i>	82
5.1.9	<i>Validação dos Microarranjos de cDNA</i>	83
5.2	ANÁLISE METABOLÔMICA EM HIPÓXIA POR ELETROFORESE CAPILAR.....	87
5.2.1	<i>Preparação das Amostras</i>	87
5.2.2	<i>Quantificação de proteínas totais</i>	87
5.2.3	<i>Análise de metabólitos catiônicos por CE-MS</i>	88
5.3	CARÊNCIA DE FERRO (II).....	90
5.3.1	<i>Análise dos genes cuja expressão é afetada pela carência de ferro (II)</i>	90
5.3.2	<i>Comparação com Hipóxia</i>	91
5.3.3	<i>Validação dos Microarranjos de cDNA</i>	97
5.4	GENES REGULADOS POR HIPÓXIA, CARÊNCIA DE Fe^{2+} , CÁDMIO E CHOQUE TÉRMICO.....	98
5.5	HIPÓXIA + GELDANAMICINA.....	100
5.6	UMA PROTEÍNA DE QUITRIDIOMICETO SIMILAR AO FATOR INIBITÓRIO DE HIF-1A (FIH).....	103
5.7	TRANSFORMAÇÃO DE <i>B. EMERSONII</i> MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM TUMEFASCIENS</i>	104
6	CONCLUSÕES	108
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
8	MATERIAL SUPLEMENTAR	119
9	SÚMULA CURRICULAR	139

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: CICLO DE VIDA DO FUNGO <i>BLASTOCLADIELLA EMERSONII</i>	14
FIGURA 2: DISTRIBUIÇÃO DOS GENES DEPOSITADOS NAS LÂMINAS DE MICROARRANJO DE cDNA, DE ACORDO COM OS PROCESSOS BIOLÓGICOS DETERMINADOS PELO CONSÓRCIO GENE ONTOLOGY.	16
FIGURA 3: VISÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE TRANSFERÊNCIA DE T-DNA POR <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	21
FIGURA 4: EXPERIMENTO DE HIPÓXIA GRADUAL.	26
FIGURA 5: EXPERIMENTO DE HIPÓXIA DIRETA	28
FIGURA 6: DESENHO ESQUEMÁTICO DA LÂMINA DE MICROARRANJO DE DNA	33
FIGURA 7: HIBRIDIZAÇÃO SELF-SELF DE HIPÓXIA GRADUAL E DIRETA.....	36
FIGURA 8: PLASMÍDEOS UTILIZADOS NA CONSTRUÇÃO DO VETOR BINÁRIO pBINPLUS-HPH	44
FIGURA 9: ESQUEMA DO PROTOCOLO DE TRANSFORMAÇÃO DE <i>B. EMERSONII</i> MEDIADA POR <i>A. TUMEFACIENS</i>	46
FIGURA 10: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM CÉLULAS DE <i>B. EMERSONII</i> SUBMETIDAS À HIPÓXIA GRADUAL.....	49
FIGURA 11: EFEITO DA DISPONIBILIDADE DE OXIGÊNIO NA CAPTAÇÃO DE GLICOSE EM HIPÓXIA GRADUAL	51
FIGURA 12: GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM HIPÓXIA GRADUAL E HIPÓXIA DIRETA	52
FIGURA 13: AGRUPAMENTO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM HIPÓXIA GRADUAL (A) E HIPÓXIA DIRETA (B).....	53
FIGURA 14: ANÁLISE DA EXPRESSÃO POR QRT-PCR DE GENES AUSENTES NOS MICROARRANJOS DE cDNA	57
FIGURA 15: GENES COM PERFIS INDUZIDOS OU REPRIMIDOS EM HIPÓXIA GRADUAL E/OU DIRETA, DISTRIBUÍDOS EM CATEGORIAS FUNCIONAIS DE ACORDO COM O GO.....	58
FIGURA 16: GENES RESPONSÁVEIS PELA BIOSÍNTESE DE S-ADENOSIL-METIONINA (SAM).....	68
FIGURA 17: EXPRESSÃO DOS GENES CODIFICANDO ENZIMAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO CENTRAL DE <i>B. EMERSONII</i> EM HIPÓXIA GRADUAL E/OU DIRETA	73
FIGURA 18: EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS DA CADEIA RESPIRATÓRIA DE <i>B. EMERSONII</i> EM HIPÓXIA GRADUAL E/OU DIRETA.....	74
FIGURA 19: ESQUEMA DAS MODIFICAÇÕES DE LIPÍDEOS PROMOVIDAS PELAS ENZIMAS Δ -9 ÁCIDO GRAXO DESATURASE E CFA SINTASE	77
FIGURA 20: VALIDAÇÃO DOS MICROARRANJOS DE cDNA DE HIPÓXIA GRADUAL POR RT-PCR QUANTITATIVO	85
FIGURA 21: VALIDAÇÃO DOS MICROARRANJOS DE cDNA DE HIPÓXIA DIRETA POR RT-PCR QUANTITATIVO.	86
FIGURA 22: ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS LIVRES INTRACELULARES POR CE-MS	90
FIGURA 23: GENES INDUZIDOS OU REPRIMIDOS DURANTE CARÊNCIA DE FERRO (II), DISTRIBUÍDOS EM CATEGORIAS FUNCIONAIS... ..	91

FIGURA 24: VALIDAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE MICROARRANJOS COM CÉLULAS EM CARÊNCIA DE FERRO POR RT-PCR	
QUANTITATIVO	98
FIGURA 25: VALIDAÇÃO DOS MICROARRANJOS DO EXPERIMENTO HIPÓXIA + GELDANAMICINA	102
FIGURA 26: ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DOS DOMÍNIOS JMJC DA PROTEÍNA HIPOTÉTICA DE <i>B. DENDROBATIDIS</i>	
(BDEG_02431.1) E DAS PROTEÍNAS JMJD5 E FIH DE METAZOÁRIOS	104
FIGURA 27: APARÊNCIA TÍPICA DOS TRANSFORMANTES RESISTENTES A HIGROMICINA B	105
FIGURA 28: ANÁLISE DO DNA GENÔMICO DOS TRANSFORMANTES DE <i>B. EMERSONII</i> POR PCR	106

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE QRT-PCR PARA VALIDAÇÃO DOS MICROARRANJOS E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE GENES AUSENTES NAS LÂMINAS.	40
TABELA 2: CATEGORIAS DO GENE ONTOLOGY (GO) MAIS REPRESENTADAS ENTRE OS GENES COM PERFIS INDUZIDOS E REPRIMIDOS EM HIPÓXIA GRADUAL E DIRETA	55
TABELA 3: LISTA DE GENES AFETADOS POR HIPÓXIA GRADUAL E/OU DIRETA OBTIDOS PELA TÉCNICA DE MICROARRANJO DE cDNA	59
TABELA 4: QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS NOS EXTRATOS METABÓLICOS DE <i>B. EMERSONII</i>	88
TABELA 5: LISTA DE GENES AFETADOS POR CARÊNCIA DE FERRO (II) OBTIDOS PELA TÉCNICA DE MICROARRANJO DE cDNA E A COMPARAÇÃO COM OS MICROARRANJOS DE HIPÓXIA GRADUAL E/OU DIRETA.....	93
TABELA 6: GENES REGULADOS POR HIPÓXIA, CARÊNCIA DE Fe^{2+} , CÁDMIO E CHOQUE TÉRMICO	99
TABELA 7: GENES DE HIPÓXIA AFETADOS PELO TRATAMENTO COM GELDANAMICINA	101

LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES

TABELA S 1: LISTA COMPLETA DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM HIPÓXIA GRADUAL E DIRETA	119
TABELA S 2: LISTA COMPLETA DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS POR CARÊNCIA DE FERRO (II) E COMPARAÇÃO COM OS MICROARRANJOS DE HIPÓXIA GRADUAL E DIRETA.....	131
TABELA S 3: LISTA COMPLETA DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO EXPERIMENTO DE HIPÓXIA + GELDANAMICINA.....	136

ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Adenosina trifosfato
ATPase – Adenosina trifosfatase
BSA – Albumina acetilada de soro bovino
Ca²⁺ - Cálcio
CaM – Calmodulina
cAMP – Adenosina monofosfato cíclico
cDNA – DNA complementar
cGMP – Guanosina monofosfato cíclico
CTAB – brometo de cetil-trimetil-amônio
DEPC – Dietilpirocarbonato
DM4 – Meio definido
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNB – ácido dinitrobenzóico
DO – Densidade óptica
DPY - 2,2'-dipyridyl
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
EST – *Expressed sequence tag*
g – Unidades de gravidade
GO – Gene Ontology
GTP – Guanosina trifosfato
h – Hora
HIF-1 – *Hypoxia-inducible Factor 1*
HSP – *Heat Shock Protein*
ID – Identidade
kDa – Quilodaltons
M – Molar
MOPS – Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
µg – Micrograma
µl – Microlitro
µm – Micrômetro
nm – Nanômetro

nM – Nanomolar

O₂ – Oxigênio molecular

PIPES – piperazina-N,N'-bis-[ácido etanossulfônico]

pb – Pares de base

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfona

PYG – Peptona – extrato de levedura - glicose

rpm – Rotações por minuto

RT-PCR – Reação de polimerização em cadeia em tempo real

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SREBP – *Sterol-response element binding protein*

TBE – Tampão Tris-Borato EDTA

TBS – Tampão tris-borato SDS

Ciclo TCA – Ciclo do ácido tricarboxílico

Tris – Tris-(hidroxometil)-aminometano

1 INTRODUÇÃO

Aproximadamente 1,7 milhão de espécies de organismos pertencentes ao ecossistema terrestre já foram descritas e catalogadas. Essa enorme variabilidade se deve a milhões de anos de evolução e revelam adaptações das espécies a distintas condições ambientais e nutricionais, o que proporciona marcantes diferenças entre esses organismos no que diz respeito a aspectos como morfologia, organização celular, fisiologia, metabolismo, entre outros.

Mesmo com inúmeras diferenças, organismos evolutivamente distantes também podem guardar características semelhantes, que foram preservadas por apresentarem vantagens evolutivas e conferirem adaptação às condições de vida vigentes. Um bom exemplo, do ponto de vista bioquímico, é o metabolismo energético de produção de energia em eucariotos. Glicose, o monossacarídeo mais abundante na natureza e fonte preferencial de carbono e energia para grande parte dos organismos (Johnston, 1999; Vaulont *et al.*, 2000), apresenta um papel central na produção de energia através da via glicolítica (glicólise), vias alternativas do metabolismo do piruvato, ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA ou ciclo de Krebs) e cadeia respiratória (transporte de elétrons e fosforilação oxidativa). No entanto, mesmo que relativamente conservada ao longo da evolução, essa rede metabólica pode ser regulada de maneira distinta entre as espécies, devido a diferentes pressões seletivas (Pfeiffer *et al.*, 2001). Deste modo, a produção de energia na forma de ATP pode ocorrer tanto de forma aeróbia (respiração) quanto anaeróbia (fermentação), dependendo do organismo, do tecido ou do estado metabólico da célula. A disponibilidade de oxigênio é, portanto um ponto chave no metabolismo e, em última instância, na sobrevivência da maioria dos organismos eucarióticos.

Na natureza, situações de privação de oxigênio podem ocorrer com uma alta frequência, por isso, os organismos desenvolveram um complexo conjunto de respostas

adaptativas celulares e moleculares, ativado pela própria diminuição da disponibilidade de oxigênio. Estas respostas são adaptativas, pois podem levar a alterações fisiológicas e metabólicas permitindo às células lidarem com o estresse associado à limitação de oxigênio e, em última instância, reforçam a sobrevivência celular. Especialmente nos habitats aquáticos, a hipóxia pode ser uma importante força motriz evolutiva resultando em estratégias fisiológicas de sobrevivência à carência de oxigênio.

Cabe enfatizar aqui que o termo “hipóxia” indica baixa tensão de oxigênio dissolvido, mas a concentração de oxigênio em que se caracteriza hipóxia é controversa na literatura, pois se baseia na mínima concentração tolerável para determinado organismo e, por isso, é variável. Em geral a concentração adotada para mamíferos e leveduras fica em torno de 5 a 10% de saturação de O₂ do ar (% satO₂).

Em 1861, Louis Pasteur (Pasteur, 1861) mostrou que o oxigênio inibe o processo fermentativo e que o consumo de glicose é inversamente proporcional à disponibilidade de oxigênio, mostrando que a glicólise é positivamente regulada por hipóxia, o chamado “Efeito Pasteur”. Tal efeito pode ser observado em diversos organismos, dentre os quais o eucarioto unicelular *Saccharomyces cerevisiae*. Análise transcricional global nessa levedura mostrou que quase todos os genes dos complexos respiratórios e de enzimas do ciclo de Krebs eram reprimidos em condições de crescimento anaeróbico, enquanto genes envolvidos na glicólise, síntese de glicerol e genes para as isoformas citoplasmáticas da álcool-desidrogenase eram induzidos (Kwast *et al.*, 2002). Medidas de fluxos metabólicos mostraram que a anóxia aumentava o fluxo glicolítico até a produção de etanol e glicerol (Nissen *et al.*, 1997), indicando que o re-direcionamento metabólico de aerobiose para anaerobiose (fermentação) é fundamentalmente controlado em nível transcricional.

O mesmo pode ser observado em células de tecido muscular esquelético de mamíferos em grandes altitudes ou durante o exercício (Vogt *et al.*, 2001), e em células de

tumores sólidos (Helmlinger *et al.*, 1997). Devido ao fato de serem submetidas a condições de hipóxia, elas não podem obter energia total da glicose pelo metabolismo oxidativo e, por isso, o metabolismo anaeróbico gera parte de seu ATP, reduzindo piruvato a lactato. Este processo se opera a uma taxa mais alta, mas produzindo menos ATP a partir da mesma quantidade de substrato (glicose).

Num estudo recente com o fungo filamentoso multicelular e aeróbico obrigatório, *Trichoderma reesei*, foi demonstrado que hipóxia e anóxia transiente causam uma diminuição na produção de ATP, como resultado de uma drástica repressão da transcrição da maioria dos genes codificando enzimas da via glicolítica e do ciclo de Krebs (Bonaccorsi *et al.*, 2006). Este tipo de resposta parece contradizer o tradicional “Efeito Pasteur” e deve estar mais relacionada a mecanismos de tolerância em longo prazo, como o observado em tartarugas tolerantes a anóxia (Stecyk *et al.*, 2004). Organismos tolerantes a hipóxia raramente ativam o metabolismo anaeróbico para suprir seu déficit energético; ao invés disso favorecem uma redução do “turnover” energético, entrando num estado chamado de suspensão de animação (Hochachka and Lutz, 2001).

Difícilmente encontrar-se-á um eucarioto tão estudado quanto *Saccharomyces cerevisiae*. Durante décadas essa levedura tem sido usada como modelo de estudo de diversas funções celulares básicas e processos bioquímicos em sistemas eucarióticos. Entretanto, no que diz respeito a estudos de resposta a hipóxia, *S. cerevisiae* torna-se limitada por ser um organismo anaeróbico facultativo, e isto deve ser considerado quando se compara essa levedura com outros modelos celulares. Além disso, *S. cerevisiae* é dotada de um metabolismo com características peculiares e versáteis, não encontradas comumente em outros eucariotos, incluindo a maioria das leveduras. Um exemplo é a produção de etanol através do metabolismo anaeróbico, mesmo na presença de oxigênio (Breunig *et al.*, 2000).

Esta tese de doutorado aborda os efeitos transcricionais decorrentes da diminuição da concentração de oxigênio dissolvido em culturas do fungo aquático *Blastocladiella emersonii* (seção 2.3), que está localizado na base da árvore filogenética dos fungos. *B. emersonii* apresenta um metabolismo estritamente aeróbico e pode ser um interessante modelo de estudo de resposta ao estresse de hipóxia, por estar potencialmente adaptado a ambientes com pouca aeração, uma vez que possui um comportamento saprofítico aquático (Lovett, 1975). Neste trabalho, analisamos as respostas transcricionais e metabólicas de *B. emersonii* a decrescentes concentrações de oxigênio dissolvido, utilizando as técnicas de microarranjos de DNA e eletroforese capilar, respectivamente.

Como será abordado na seção 2.2, HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) é o principal regulador da homeostase de oxigênio em metazoários. Sabe-se que quelantes de ferro (II) como 2,2'-dipyridyl, são conhecidos agentes mimetizadores de hipóxia através da estabilização de HIF-1 α (Semenza, 2007) e que inibidores da proteína de choque térmico HSP90 como a geldanamicina, induzem a degradação de HIF-1 α de maneira independente de oxigênio (Liu and Semenza, 2007). Por isso, procuramos encontrar evidências de um possível sistema sensor de oxigênio em *B. emersonii*, similar ao HIF-1, pela comparação entre as respostas transcricionais globais de células submetidas à hipóxia, carência de ferro (II) e tratamento com geldanamicina seguido de hipóxia. Este estudo comparativo, realizado nesta tese, embora não tenha resultado na elucidação do mecanismo regulatório da resposta à concentração de oxigênio em *B. emersonii*, forneceu evidências da existência de um mecanismo similar ao HIF-1. Pelo menos no que diz respeito ao padrão da resposta transcricional à hipóxia e aos estímulos que afetam a atividade deste regulador, como carência de ferro (II) ou inibição da HSP90.

A transformação de *Blastocladiella emersonii* foi sempre um dos objetivos do laboratório. Diversos estudos atualmente conduzidos neste fungo poderiam ser

consideravelmente enriquecidos pela utilização de técnicas de manipulação genética, entretanto, até o momento *B. emersonii* revelou-se inapropriada em diversos experimentos de transformação, quando testada por diferentes metodologias, como eletroporação, uso de protoplasto e até biobalística. Como objetivo adicional, resolvemos desenvolver um protocolo de transformação de *B. emersonii* mediado pela bactéria gram-negativa *Agrobacterium tumefaciens* (seção 2.5). Este tipo de transformação, comumente utilizado em plantas, mostrou ser eficiente para diversos fungos, leveduras e até células humanas (Bundock *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2000; de Groot *et al.*, 1998; Kunik *et al.*, 2001; Zwiers and De Waard, 2001). Demonstramos que *Agrobacterium tumefaciens* pode transferir seu T-DNA, contendo um cassete de resistência a higromicina B, para o DNA genômico de células de *Blastocladiella emersonii*. Este trabalho representa o primeiro protocolo de transformação de Blastocladiomicetos existente até o momento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos evolutivos nas vias de produção de ATP

Após o surgimento do oxigênio na atmosfera, o metabolismo aeróbico nos eucariotos se desenvolveu com o surgimento das mitocôndrias. Este tipo de metabolismo apresenta uma marcante vantagem sobre o metabolismo fermentativo que é o alto rendimento na produção de ATP a partir de uma mesma quantidade de glicose. No entanto, produção aeróbica de ATP apresenta uma menor velocidade quando comparada com a anaeróbica. Isto se deve ao fato de que no catabolismo de qualquer substrato, parte de sua energia livre é conservada nas moléculas de ATP, enquanto outra parte é necessariamente consumida para poder alimentar as reações envolvidas no processo. Portanto, reações que consomem menos da energia contida no substrato, como no caso da respiração, ocorrem em menor velocidade, mas com rendimento maior. Por outro lado, a maior utilização da energia contida no substrato resulta em um processo mais rápido, porém com menor rendimento.

De fato, o metabolismo aeróbico gera 38 mols de ATP por mol de glicose consumida, ao passo que o metabolismo fermentativo apresenta um rendimento de apenas 2 mols de ATP por mol de glicose consumida. Foi demonstrado recentemente por Pfeiffer e colaboradores (Pfeiffer *et al.*, 2001) que o metabolismo fermentativo apresenta uma vantagem sobre o respiratório em casos em que há disputa por fontes de carbono ou limitação de oxigênio. Nessas situações, levam vantagem os organismos capazes de consumir mais rapidamente o substrato disponível. Por outro lado, consumir rapidamente os nutrientes, com baixo rendimento, limita o potencial crescimento das populações. Segundo os autores, o modelo pelo qual os organismos conseguiram se aproveitar do metabolismo aeróbico foi o de cooperação entre os competidores, sejam eles da mesma espécie ou de espécies distintas. Segundo os modelos simulatórios utilizados, em ambientes com baixa taxa de difusão celular, o metabolismo aeróbico tende a prevalecer, pois as células tendem a

estar rodeadas por membros de seu próprio estilo metabólico. Conforme a taxa de difusão celular aumenta, os organismos passam a disputar os mesmos substratos de maneira global e, assim, os fermentadores prevalecem. A partir destas evidências, levanta-se a hipótese de que o alto rendimento da produção de ATP proporcionado pelo metabolismo aeróbico pode ter ajudado a direcionar a evolução de organismos unicelulares para formas multicelulares indiferenciadas. O fungo dimórfico *Mucor racemosus* encaixa-se perfeitamente neste modelo, uma vez que utiliza o metabolismo fermentativo quando na forma unicelular (levedura), mas respira quando na forma multicelular (micélio) (Inderlied and Sypherd, 1978).

2.2 Respostas a carência de oxigênio

A vida aeróbica na Terra iniciou-se há dois bilhões de anos e sua evolução resultou em organismos extremamente dependentes de oxigênio. Tal dependência faz com que a exposição de tais organismos a tensões de oxigênio fora de certo limite fisiológico resulte em estresse celular e conseqüentemente toxicidade. Em seres humanos, particularmente, a hipóxia está relacionada a diversas doenças, principalmente àquelas relacionadas com problemas vasculares, incluindo todas as formas de anemias e isquemias. O principal regulador de homeostase de oxigênio em metazoários é o HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor 1*), um complexo transcricional que, sob condições de hipóxia regula genes via elementos responsivos a hipóxia (HRE) presentes nas regiões promotoras desses alvos. HIF-1 é um heterodímero composto por duas subunidades, α e β , ambas pertencentes à família de proteínas PAS, com domínios bHLH (*basic helix-loop-helix*). HIF-1 β mantém seus níveis constantes sob hipóxia, sendo, portanto totalmente insensível à O₂. Diferentemente, os níveis de HIF-1 α são altamente regulados pela concentração de oxigênio dissolvido. Em condições de hipóxia, a degradação de HIF-1 α é inibida e essa proteína se acumula e forma um dímero

com HIF-1 β , ligando-se aos elementos HRE em genes-alvo e recrutando proteínas co-ativadoras que levam ao aumento da transcrição desses genes (Semenza, 2007). Tem sido demonstrado um papel fundamental do fator HIF-1 α na resposta de diferentes tecidos submetidos à falta de oxigênio, inclusive em tumores sólidos malignos. Estes tumores, por crescerem rapidamente, geralmente são mal vascularizados e sofrem hipóxia em seu interior. HIF-1 α acaba, então, sendo acumulado nessas células, ativando diversos processos celulares de adaptação incluindo angiogênese, aumento da distribuição de oxigênio (eritropoetina) e também o aumento do metabolismo anaeróbico, através da indução da expressão de diversas enzimas glicolíticas e da lactato desidrogenase (Marin-Hernandez *et al.*, 2009).

Em condições de normóxia, HIF-1 α é continuamente sintetizado, e degradado pela ligação da proteína VHL (*von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein*), a qual recruta HIF-1 α para ubiquitinação e degradação pelo proteassomo. A ligação da proteína VHL a HIF-1 α é dependente da hidroxilação de HIF-1 α realizada pela proteína *prolyl hydroxylase domain protein 2* (PHD2), uma dioxigenase que utiliza O₂ e α -cetoglutarato como substratos, gerando CO₂ e succinato. Esta enzima é responsável pela hidroxilação de resíduos de prolina (Pro⁴⁰² e Pro⁵⁶⁴) presentes no domínio de degradação oxigênio-dependente (ODDD) de HIF-1 α , também conhecidos por PHDs (*Prolyl Hydroxylase domain-containing proteins*) ou EGLN (*egg-layin-defective nine*) (Semenza, 2007). Desta maneira, em condições de baixo oxigênio, a hidroxilação dos resíduos Pro⁴⁰² e Pro⁵⁶⁴ de HIF-1 α é deficiente, impedindo a ligação de VHL e, por consequência, a degradação pelo proteassomo.

O fator inibitório de HIF-1 (FIH-1) é outra dioxigenase dependente de α -cetoglutarato, que hidroxila um resíduo de asparagina (Asp⁸⁰³) de HIF-1 α , levando à sua inativação devido ao bloqueio de sua interação com seus coativadores CBP e p300, impedindo assim, a indução de genes de hipóxia (Semenza, 2007; Taylor, 2008). Tanto PHD2 quanto FIH contêm Fe²⁺ em seus centros catalíticos (Semenza, 2007). Por esta razão,

quelantes deste íon são conhecidos por mimetizarem os efeitos de hipóxia através da estabilização de HIF-1 α .

HIF-1 α também pode ser regulado de maneira independente de oxigênio, PHD e VHL, através da proteína RACK1 (*receptor of activated protein C kinase*). RACK1 compete o domínio PAS-A de HIF-1 α com a chaperona molecular HSP90 (*heat shock protein 90*). Quando ligada, RACK1 recruta HIF-1 α à ubiquitinação e degradação pelo proteassomo. No entanto, HSP90 compete com RACK1 protegendo HIF-1 α e mantendo seus níveis basais na célula, independentemente da concentração de oxigênio. Inibidores da HSP90 como o antibiótico geldanamicina são conhecidos por induzir a degradação de HIF-1 α independentemente de oxigênio (Liu and Semenza, 2007).

Leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, são anaeróbios facultativos capazes de crescer com ou sem uma mitocôndria ativa (Ferguson and von Borstel, 1992) e, apesar disso, têm sido estudadas como modelo de resposta à privação de oxigênio. Apesar de suas limitações quanto a comparações com mamíferos, os estudos conduzidos com essa levedura ilustram o quão poderosas são as pressões seletivas inerentes a um metabolismo anaeróbico facultativo. A necessidade de sobreviver e crescer em diferentes tensões de oxigênio promoveu o surgimento de um sistema coordenado e simultâneo que regula a expressão de uma série de genes, muitas vezes sem qualquer ligação entre eles (Zitomer *et al.*, 1997). O sistema mais estudado de resposta à hipóxia em *S. cerevisiae* é o sistema Rox1-Hap1 e Hap2/3/4/5 (Kwast *et al.*, 1998; Lai *et al.*, 2006; Zitomer *et al.*, 1997). De acordo com este sistema, níveis normais de heme são suficientes para ativar fatores de transcrição como Hap1 e Hap2/3/4/5, que controlam a expressão de genes aeróbicos. Quando os níveis de oxigênio caem, a biossíntese de heme também declina, resultando na desativação destes fatores e, conseqüentemente, na regulação negativa dos genes por eles regulados. Um dos genes-alvo destes fatores é *Rox1*, que codifica um repressor de genes anaeróbicos (Kwast *et*

al., 2002; Laabs *et al.*, 2003) e que também regula a expressão de *UPC2* (Kwast *et al.*, 2002), um ativador de genes anaeróbicos.

Além deste sistema, existe outro mecanismo que regula a resposta transcricional de *S. cerevisiae* a condições anaeróbicas. Certos genes induzidos em hipóxia como *OLE1*, que codifica uma desaturase essencial para síntese de ácidos graxos, chamada *Δ -9-fatty acid desaturase*, possuem em suas sequências promotoras um elemento chamado LORE (low oxygen responsive element), onde se ligam um complexo de fatores responsivos à hipóxia que ainda não são bem conhecidos (Webster, 2003). A transcrição de *OLE1* em leveduras é reprimida por ácidos graxos insaturados e tem sua indução dependente da proteína Mga2p (Nakagawa *et al.*, 2003). Mga2p fica normalmente ligada à membrana do retículo endoplasmático e é ativada por uma clivagem dependente de ubiquitinação. Uma vez liberada, Mga2p age protegendo os mRNAs de genes-alvo como *OLE1* (Kandasamy *et al.*, 2004). Embora as sequências LORE não se assemelhem com as sequências HRE (hypoxia-response element) reconhecidas por HIF-1 em mamíferos, e apesar de não haver sido comprovado o envolvimento de prolil-hidroxilases no sistema de leveduras, alguns autores têm sugerido que ambos os sistemas possuem mecanismos semelhantes. Esta conclusão se deve principalmente às respostas observadas com metais de transição e quelantes de ferro nos dois sistemas (Jiang *et al.*, 2001; Vasconcelles *et al.*, 2001; Webster, 2003).

É interessante notar que nem sempre o estresse de hipóxia é prejudicial. Em certos organismos patogênicos observou-se que quando estes organismos enfrentam processos inflamatórios, trombozes e necroses em seus hospedeiros, o estresse de hipóxia atua como um sinal regulador para a indução de processos de virulência essenciais para a sobrevivência do patógeno (Chun *et al.*, 2007). Em bactérias patogênicas classificadas como aeróbias estritas, como *Neisseria meningitidis* ou *Bordetella pertussis*, a mutação de um fator

homólogo ao regulador responsivo a hipóxia Fnr, de *Escherichia coli*, levou à atenuação de virulência em animais de experimentação (Bartolini *et al.*, 2006; Wood *et al.*, 1998).

Dentre os fungos, alguns patógenos como *Candida albicans* são capazes de realizar fermentação anaeróbica em meios ricos. No entanto, nestes organismos o oxigênio molecular é necessário para síntese de moléculas essenciais como ergosterol, NAD e heme, difíceis de obter mesmo em hospedeiros. Deste modo, a hipóxia em fungos, tanto patogênicos quanto não patogênicos, deve ser, em princípio, um desafio mais significativo do que para bactérias, mesmo naquelas aeróbicas estritas.

O ascomiceto não-patogênico *Schizosaccharomyces pombe* possui um sistema homólogo ao SREBP (“sterol-response element binding protein”) de mamíferos e foi mostrado que este sistema tem um papel regulador da adaptação à hipóxia neste fungo (Hughes *et al.*, 2005; Todd *et al.*, 2006). Este fator também foi descrito no basidiomiceto patógeno *Cryptococcus neoformans* e parece estar relacionado com sua patogenicidade, além de funcionar como sistema sensor de oxigênio (Chang *et al.*, 2007).

Neste sistema, em mamíferos, SREBP é sequestrado para o retículo endoplasmático (RE), quando na presença de esteróis como o colesterol. Na ausência deste sinal, entretanto, SREBP sofre clivagens específicas que levam à ativação de genes que controlam o metabolismo de lipídeos. Na presença de esteróis, Scap (“SREBP cleavage-activating protein”) se liga a SREBP no retículo endoplasmático e assume uma conformação que permite a ligação da proteína Insig (“insulin-induced gene”). Isto mantém o complexo SREBP-Scap no retículo, pois impede a interação de SCAP com COPII *vesicle-formation proteins* Sar1, Sec23 e Sec24. Na ausência de esteróis, a ligação a Insig é rompida e o complexo SREBP-Scap é englobado por vesículas de transporte cobertas por COPII. O complexo é então transportado ao complexo de Golgi, onde sofre duas clivagens proteolíticas sequenciais mediadas pelas proteases Site 1 (S1P) e Site 2 (S2P), liberando o

domínio N-terminal de SREBP que será transportado ao núcleo (Espenshade, 2006). A ação deste regulador sobre sequências SRE (“sterol regulatory element”) presentes nos promotores de genes-alvo, leva ao aumento da síntese e captura de colesterol. Em *S. pombe*, a via homóloga a SREBP controla a expressão de genes envolvidos na síntese de ergosterol e algumas evidências sugerem que a hipóxia sinaliza esta via pela redução dos níveis de esteróis, indicando que esta SREBP pode funcionar como um sistema sensor de oxigênio (Hughes *et al.*, 2005; Todd *et al.*, 2006).

2.3 O modelo de estudo: *Blastocladiella emersonii*

O fungo aquático não-filamentoso *Blastocladiella emersonii* pertence à classe dos Blastocladiomicetos, ordem Blastocladales (Hibbett *et al.*, 2007) e foi isolado pela primeira vez por Cantino, em 1951. Em seu ciclo de vida, *B. emersonii* sofre drásticas mudanças morfológicas e bioquímicas, principalmente durante dois estágios de diferenciação celular: a germinação e a esporulação. Ao longo desses estágios, é possível identificar morfologicamente quatro formas celulares que se alternam de maneira cíclica: zoósporo, gérmen, célula vegetativa e zoosporângio.

O zoósporo, uma célula móvel uninucleada, dotada de um flagelo e sem parede celular, germina rapidamente quando exposto a um meio nutriente ou solução inorgânica contendo certos cátions monovalentes (K^+ e Na^{2+}), AMP cíclico (cAMP), GMP cíclico (cGMP) ou inibidores da fosfodiesterase de cAMP (Gottschalk and Sonneborn, 1982; Maia *et al.*, 1979; Soll and Sonneborn, 1972). Em meio nutriente DM4, a 27°C, o zoósporo retrai o seu flagelo e forma uma fina parede celular de quitina, nos primeiros 15 minutos, transformando-se em uma célula denominada esferócito. Aproximadamente 45 minutos após a indução da germinação, um tubo germinal (rizóide primário) se desenvolve dando origem ao gérmen que é capaz de crescer. Este tubo germinal dará origem por ramificação a um

sistema de rizóides através dos quais os nutrientes são absorvidos (Lovett, 1975). Aos 120 minutos ocorre a primeira divisão nuclear, marcando o fim da germinação e o início do crescimento vegetativo exponencial, caracterizado por intensa cariocinese não acompanhada citocinese, produzindo um cenócito. Essa fase de desenvolvimento pode durar mais de 15 horas a 20°C e quando o meio se torna carente em nutrientes, as células entram em processo de esporulação. Durante esse estágio, em condições normais de cultivo, cada cenócito vegetativo adquire em poucas horas uma parede delgada e não pigmentada, formando assim o zoosporângio. A esporulação pode ser induzida em condições experimentais por meio da lavagem e incubação das células vegetativas em uma solução tamponada contendo 1mM Ca^{2+} . Após 60 minutos da indução da esporulação, observa-se o aparecimento de um septo basal que separa os rizóides do corpo da célula. Cerca de 60 minutos após a observação do septo verifica-se a formação de uma papila de descarga no ápice do zoosporângio através da qual serão liberados os zoosporos no final do processo. Em uma fase mais tardia, observa-se a clivagem do citoplasma em torno de cada núcleo culminando com a formação e liberação dos zoósporos para o meio, completando assim o ciclo de vida do fungo (**Figura 1**). Vale lembrar que os experimentos deste trabalho foram realizados somente com células em crescimento vegetativo.

Figura 1: Ciclo de vida do fungo *Blastocladiella emersonii* (Adaptado de Lovett, 1975)

Blastocladiella emersonii é um interessante modelo de estudos de expressão gênica e diferenciação celular entre os fungos primitivos, pois está localizada na base da árvore filogenética dos fungos e, além disso, por apresentar diversas mudanças bioquímicas e morfológicas ao longo de seu ciclo de vida.

Com o objetivo de contribuir para o entendimento da complexidade do genoma de *Blastocladiella emersonii*, recentemente foi realizado um sequenciamento em larga escala de clones de cDNA (ESTs ou “expressed sequence tags”), disponível no endereço

<http://blast0.iq.usp.br/>, provenientes de bibliotecas de expressão construídas a partir de mRNAs de células isoladas de diversos estágios do ciclo de vida do fungo e sob condições de estresse por exposição a cádmio e choque térmico (Georg and Gomes, 2007; Ribichich *et al.*, 2005). Foram sequenciados parcialmente, a partir das extremidades 5', aproximadamente 20.000 clones de cDNA provenientes de 10 diferentes bibliotecas. Este seqüenciamento produziu 16.984 ESTs de alta qualidade que foram reunidos em 4.873 transcritos putativos, dos quais 48% não apresentaram qualquer similaridade com seqüências disponíveis em bases de dados públicas. Foram construídas lâminas de microarranjos de cDNA (Salem-Izacc *et al.*, 2009; Georg and Gomes, 2007) que contêm 3.773 ESTs distintas, depositadas pelo menos em duplicata, provenientes das bibliotecas de estresse por cádmio e choque térmico (804 ESTs) e de fases do ciclo de vida (2.969 ESTs). A classificação destes ESTs, conforme o consórcio Gene Ontology, é mostrada na **Figura 2**, em termos de porcentagem de genes anotados em cada processo biológico.

Figura 2: Distribuição dos genes depositados nas lâminas de microarranjo de cDNA, de acordo com os processos biológicos determinados pelo consórcio Gene Ontology.

Este projeto de seqüenciamento revelou seqüências expressas em *B. emersonii* previamente consideradas específicas de animais ou plantas, além de outras altamente divergentes quando comparadas a de outros fungos (Ribichich *et al.*, 2005; Ribichich *et al.*, 2006). Além disso, proporcionou um melhor entendimento das respostas transcricionais de *B. emersonii* à diferenciação celular (Salem-Izacc *et al.*, 2009; Vieira and Gomes, 2009) e estresses ambientais (Georg and Gomes, 2007; Georg *et al.*, 2009).

Outro fruto deste projeto de seqüenciamento é um trabalho recente em que foi sugerido que o cGMP acumulado durante a esporulação de *B. emersonii* é produzido por uma guanilato ciclase que responde a óxido nítrico (NO) (Vieira *et al.*, 2009). Este tipo de transdução de sinal nunca foi encontrado em fungos superiores, no entanto parece que fungos primitivos como os Blastocladiomicetos, que são dotados de células móveis,

provavelmente retiveram estes genes, uma vez que a sinalização por cGMP está envolvida com motilidade celular.

Por estas características tão peculiares, *B. emersonii* tem se mostrado um interessante e promissor modelo para o estudo de diferenciação celular, evolução, sinalização celular e expressão gênica diferencial em resposta a estresses. No caso deste trabalho, há fortes evidências de que este fungo pode ser também um interessante modelo de estudo de resposta ao estresse de hipóxia em eucariotos, já que deve estar potencialmente adaptado a ambientes com pouca aeração, devido ao seu comportamento saprofítico aquático (Lovett, 1975).

2.4 Estudos metabolômicos utilizando a técnica de Eletroforese Capilar

A metabolômica, por analogia aos termos genômica, transcriptômica e proteômica, pode ser definida como uma análise qualitativa e quantitativa de todos os compostos de baixo peso molecular (metabólitos) presentes numa célula. A abordagem metabolômica tem se tornado um campo emergente da bioquímica analítica e o desenvolvimento deste método para uma análise quantitativa abrangente de ácidos orgânicos, carboidratos e nucleotídeos é de grande valia nesta nova era de genômica funcional. Proteínas e metabólitos são os principais efetores de fenótipo por serem as entidades funcionais nas células. Sendo assim, a análise de mudanças metabólicas não só fornece informações sobre o estado metabólico da célula, como também complementa estudos de expressão gênica e proteômica (Fraenkel, 1992; Ideker *et al.*, 2001; Raamsdonk *et al.*, 2001; Spinnler *et al.*, 1996).

Apesar de sua importância, ainda não foram desenvolvidas muitas metodologias para a análise metabolômica. Isto se deve às características de grande parte dos metabólitos como alta polaridade, não-volatilidade e baixa detectabilidade, dentre outras. Além disso, o alto número de metabólitos diferentes presentes numa célula, cerca de 1000, torna a análise complicada. Uma das primeiras análises metabolômicas em larga escala foi realizada pela

metodologia de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) (Fiehn *et al.*, 2000a; Fiehn *et al.*, 2000b). No entanto, esta metodologia é limitada pela necessidade de múltiplas derivatizações e devido a não-volatilização de muitos metabólitos (Soga *et al.*, 2003). O método de cromatografia líquida acoplada espectrometria de massas (LC-MS) possui vantagens sobre GC-MS, pois não requer volatilização e pode trabalhar em temperaturas de análise mais baixas. No entanto, este método também possui limitações, principalmente no que tange a metabólitos polares (Tanaka *et al.*, 2008). Para a análise de ácidos orgânicos, a técnica mais comumente utilizada é a de HPLC (“high performance liquid chromatography”) com detecção por UV (HPLC-UV), no entanto este método sofre com a baixa sensibilidade e seletividade e frequentemente requer derivatização, o que aumenta o tempo de análise.

O método de eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS) apareceu recentemente como uma poderosa ferramenta para a análise de espécies químicas carregadas (Cao and Moini, 1998; Soga and Heiger, 2000). A alta resolução obtida por esta técnica permitiu seu uso para determinação de diversos metabólitos aniônicos (Soga *et al.*, 2002a; Soga *et al.*, 2002b) e recentemente ela tem se demonstrado muito eficiente em análises metabolômicas em larga escala (Soga *et al.*, 2003). Apesar de esta técnica ser bastante sensível e abrangente, no sentido de ser capaz de analisar um grande número de metabólitos, ela ainda não é amplamente utilizada pelos grupos de pesquisa devido às dificuldades de padronização das metodologias.

Uma alternativa comumente utilizada é a eletroforese capilar acoplada à detecção por fotometria indireta em UV (CE-UV). Trabalhos recentes descrevem o uso desta técnica para análise dos ácidos carboxílicos intermediários do ciclo de Krebs (Markuszewski *et al.*, 2003) e de metabólitos da via glicolítica (Markuszewski *et al.*, 2005). A desvantagem desta técnica

com relação à de CE-MS é que são necessários padrões comerciais dos metabólitos analisados, enquanto que a detecção por espectrometria de massas não os requer.

Neste trabalho realizamos uma análise metabolômica parcial de *B.emersonii* através das técnicas de CE-MS, com a ajuda do Prof. Dr. Nilson A. de Assunção do Departamento de Ciências Exatas e da Terra da Universidade Federal de São Paulo. As análises foram realizadas no laboratório liderado pelo Prof. Dr. Etelvino J. H. Bechara no Instituto de Química da USP.

2.5 Transformação de eucariotos mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

O sistema de transformação mediado por *Agrobacterium tumefaciens* é comumente utilizado em plantas. Entretanto, ultimamente este sistema tem se mostrado bastante útil em experimentos de transformação com diversos fungos, leveduras e até mesmo células humanas (Bundock *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2000; de Groot *et al.*, 1998; Kunik *et al.*, 2001; Zwiers and De Waard, 2001).

O gênero *Agrobacterium* pertence às bactérias gram-negativas de solo, encontradas comumente em associação com plantas, podendo causar diversas doenças. Infecções pela espécie *Agrobacterium tumefaciens* causam tumores em uma série de tipos vegetais, incluindo a maioria de dicotiledôneas, algumas monocotiledôneas e algumas gimnospermas (Matthysse, 2007). A indução do crescimento tumoral se dá devido à inserção de parte de seu DNA (T-DNA) localizado em um plasmídeo Ti (Tumor inducing) de 200 kpb.

Após a migração ao genoma hospedeiro, são expressos genes naturalmente presentes no T-DNA, que codificam enzimas que participam da síntese de hormônios reguladores de crescimento de plantas. Tal expressão resulta em um crescimento tecidual descontrolado e, conseqüentemente em tumorigênese. O plasmídeo Ti também contém uma região de virulência composta por uma série de genes *vir*, necessários à tumorigênese (Zhu *et al.*,

2000; Zupan *et al.*, 2000). Os genes de virulência são induzidos por compostos fenólicos produzidos pelas plantas. Em laboratório, essa indução é feita com acetoseringona, mas em certas cepas super-virulentas como a EHA105 utilizada neste trabalho, essa indução não é necessária.

As proteínas codificadas pela região de virulência estão envolvidas em transporte, formação e provavelmente integração do T-DNA (Hooykaas and Beijersbergen, 1994; Zhu *et al.*, 2000). A região T do plasmídeo Ti é flanqueada por duas repetições de 24 pb, que representa o sinal cis-atuante para o sistema de entrega à célula hospedeira, onde será inserida aleatoriamente no genoma.

Foi observado que toda a sequência do T-DNA pode ser deletada e substituída por outra, sem qualquer efeito deletério na transferência do DNA ao hospedeiro. Graças a isso, desenvolveu-se o sistema de vetor binário em que a região de virulência e o T-DNA são separados em dois plasmídeos distintos, permitindo uma manipulação genética mais fácil do vetor binário, agora menor, contando o T-DNA (Hoekema *et al.*, 1983). A **Figura 3**, a seguir, ilustra o processo de transferência de T-DNA por *A. tumefaciens*.

Figura 3: Visão esquemática do processo de transferência de T-DNA por *Agrobacterium tumefaciens*. (Adaptado de Michielse *et al.*, 2005).

3 OBJETIVOS

O propósito central deste trabalho foi investigar e comparar as respostas transcricionais do fungo *Blastocladiella emersonii* quando submetido à carência de oxigênio, através do uso da técnica de microarranjos de cDNA. Também procuramos obter evidências de um mecanismo sensor de hipóxia semelhante à via de HIF-1 de mamíferos, através de comparações entre as respostas transcricionais a hipóxia, carência de ferro (II) e hipóxia com tratamento prévio com a droga geldanamicina.

Como objetivo adicional, desenvolvemos um protocolo de transformação de *Blastocladiella emersonii* baseado na transferência de DNA pelo fitopatógeno *Agrobacterium tumefaciens*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo de *Blastocladiella emersonii*

Culturas de *B. emersonii* são renovadas semanalmente através do repique de zoósporos em placas de Petri contendo o meio PYG-ágar. As placas contendo zoósporos são mantidas a 28°C por cerca de 1 h até que estes tenham começado a germinar, aderindo à superfície do ágar. Em seguida a placa pode ser guardada em geladeira a 4°C por até uma semana, até que são então transferidas para uma estufa a 28°C até esporulação.

4.2 Meios de cultura

- PYG-ágar: peptona 0,125%; extrato de levedura 0,125%; glicose 0,15%; ágar 1,5%
- DM4 (Maia and Camargo, 1974): CaCl₂ 1mM; MgSO₄ 10 mM; FeSO₄·7H₂O 0,6 µg·mL⁻¹; CuSO₄·5 H₂O 0,1 µg·mL⁻¹; ZnSO₄·7 H₂O 0,2 µg·mL⁻¹; MnSO₄·H₂O 0,2 µg·mL⁻¹; glicose 0,33%; tiamina 0,04 µg·mL⁻¹; glicina 0,2 mM; L-histidina 0,13 mM; L-isoleucina 0,4 mM; L-lisina HCl 0,4 mM; L-metionina 0,1 mM; L-fenilalanina 0,2 mM; L-serina 0,2 mM; L-treonina 0,4 mM; L-triptofano 0,04 mM; L-tirosina 0,2 mM; L-valina 0,4 mM; L-arginina 0,24 mM; ácido glutâmico 2,7 mM; extrato de levedura 120 µg·mL⁻¹; NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 1 mM pH 6,8; tampão Tris-maleato 3,5 mM; pH 6,8. O pH do meio foi ajustado com KOH 1M e a concentração final de K⁺ foi ajustada para 50 mM com KCl 1M.
- LB: triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,5
- LB-ágar: meio LB contendo 1,5% ágar
- SOB: triptona 2%, extrato de levedura 5%, NaCl 0,06%, KCl 0,02%, pH 6,8)
- MM: K₂HPO₄ 3g·L⁻¹, NaH₂PO₄ 1g·L⁻¹, NH₄Cl 1g·L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.3g·L⁻¹, KCl 0.15g·L⁻¹, CaCl₂ 0.005g·L⁻¹, FeSO₄·7H₂O 0.0025g·L⁻¹, glicose 10mM, pH 7.2

- IM: meio MM contendo 40 mM 2-[N-morpholino] ethanesulphonic acid (MES), 10 mM glicose, 0.5% (w/v) glicerol, pH 5.3
- IM-ágar: meio IM contendo 5 mM glicose e 1,5% ágar

4.3 Linhagens bacterianas

- *Escherichia coli* - Cepa DH5 α [*supE44 lacU169 (80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA11 gyrA96 thi-1relA1*]
- *Agrobacterium tumefaciens* - Cepa EHA105

4.4 Técnicas gerais de Biologia Molecular

Procedimentos e técnicas comumente utilizadas na extração, manipulação e modificação de ácidos nucleicos foram realizados segundo descrito na literatura (Ausbel, 1992; Sambrook, 1989), ou, ainda, de acordo com protocolos específicos fornecidos em produtos, equipamentos e kits comerciais utilizados.

4.5 Cultivo de *B. emersonii* em biorreator

O cultivo foi realizado em 400 mL de meio DM4 (seção 4.2) em um biorreator equipado com eletrodos de pH e de oxigênio dissolvido (Rosemount Analytical[®]). O pH do meio foi mantido constante através da adição automática de NaOH ou HCl 0.5 M, utilizando duas bombas peristálticas (Watson-Marlow[®]). Uma mistura de ar e nitrogênio ultra-puro foi injetada no biorreator a uma vazão total fixada em 350 mL·min⁻¹. Para a concentração de oxigênio dissolvido, dois fluxômetros (Aalborg[®]) foram usados para ajustar o fluxo de cada gás de acordo com a concentração de oxigênio medida. Para manter o pH e o oxigênio dissolvido constantes, foi utilizado o equipamento PLC (“Programable Logic Controller”) (Unitronics[®]), o qual opera automaticamente as bombas peristálticas e os fluxômetros para

manter pH e oxigênio dissolvido nas condições programadas. Aliquotas de células foram retiradas com a ajuda de uma seringa estéril, filtradas sob vácuo em papel 3mm (Whatman®), lavadas com água *milli-Q* autoclavada, imediatamente congeladas sob nitrogênio líquido e guardadas em freezer -70°C.

4.6 Experimentos de Hipóxia Gradual (HG)

O reator, contendo 400 mL de meio DM4, foi inoculado com $6 \cdot 10^5$ zoósporos·mL⁻¹ em normóxia (70% de saturação de oxigênio) e pH 6,8. As células foram cultivadas por 6,5 h a 28°C, correspondendo à fase de crescimento vegetativo. Em seguida a saturação de oxigênio foi diminuída de seu valor inicial de 70% (C70) para 35% (C35), 17,5% (C17.5), 5% (C5), 1% (C1) e 0% (C0), a cada 1 h. Na etapa de 0% (C0), foi injetado somente nitrogênio ultrapuro por uma hora e, em seguida, o nível de oxigênio foi restabelecido ao seu valor inicial, 70% de saturação (C70r). A **Figura 4**, a seguir, ilustra o experimento de hipóxia gradual (HG).

Ao final de cada etapa de uma hora, foram retiradas alíquotas de células para isolamento de RNA total. Também foram retiradas alíquotas de meio de cultura em diferentes tempos do experimento para a determinação das concentrações de glicose e lactato extracelular. O experimento foi realizado em triplicata e a amostra controle utilizada para os experimentos de microarranjos de cDNA foi sempre a C70. As hibridizações foram realizadas contra todas as outras condições: C35, C17.5, C5, C1, C0 e C70r.

Figura 4: Experimento de Hipóxia Gradual. Após 6,5 horas de cultivo (seta), a saturação de oxigênio foi diminuída de seu valor inicial de 70% (C70) para 35% (C35), 17,5% (C17.5), 5% (C5), 1% (C1) e 0% (C0), em períodos de 1 h. Na etapa de 0% (C0), foi injetado somente nitrogênio ultrapuro por uma hora e, em seguida, o nível de oxigênio foi restabelecido ao seu valor inicial, 70% de saturação (C70r). As pontas de setas indicam os pontos de retirada de alíquotas para isolamento de RNA total.

4.7 Quantificação de glicose e lactato extracelular

Foram retiradas alíquotas de 1 mL de cultura durante diferentes tempos do experimento de hipóxia gradual (seção 4.6), em três réplicas biológicas independentes. As alíquotas foram centrifugadas e os sobrenadantes congelados para posterior dosagem de glicose e lactato. As quantificações foram realizadas no equipamento YSI 2700 Select (Yellow Springs Instruments Co.), segundo as especificações do fabricante. Este aparelho utiliza uma enzima específica para o substrato de interesse, imobilizada entre duas membranas, uma de policarbonato e outra de acetato de celulose. O substrato a ser dosado é

oxidado, produzindo peróxido de hidrogênio, que por sua vez é oxidado no eletrodo de platina, produzindo elétrons. Este fluxo de elétrons é proporcional à concentração de peróxido de hidrogênio e por sua vez à concentração de substrato.

4.8 Experimentos de Hipóxia Direta (HD)

As condições de cultivo foram idênticas às de hipóxia gradual (seção 4.6), mas ao invés de diminuir o oxigênio dissolvido gradualmente, a concentração foi levada rapidamente de normóxia (saturação de 70%) para hipóxia 1% (saturação de 1%). A cultura foi mantida em hipóxia por 5 h e alíquotas foram retiradas após 1 hora (C1_1h) e 5 horas (C1_5h). Depois disto, os níveis de oxigênio foram restaurados para 70% de saturação por 1 hora e uma alíquota foi também retirada (C70r_1h). O experimento foi realizado em triplicata e a amostra controle utilizada para os experimentos de microarranjo de cDNA foi sempre a C70. As hibridizações foram realizadas contra todas as outras condições: C1_1h, C1_5h e C70r_1h. A **Figura 5**, a seguir, ilustra o experimento de hipóxia direta (HD).

Figura 5: Experimento de Hipóxia Direta. Após 6,5 horas de cultivo (seta), a saturação de oxigênio foi diminuída de seu valor inicial de 70% para 1% de saturação. A cultura foi mantida em hipóxia por 5 h e alíquotas foram retiradas após 1 hora (C1_1h) e 5 horas (C1_5h). Em seguida, o nível de oxigênio foi restabelecido ao seu valor inicial, 70% de saturação (C70r). As pontas de setas indicam os pontos de retirada de alíquotas para isolamento de RNA total.

4.9 Experimento de Carência de Ferro

B. emersonii foi cultivada no mesmo biorreator utilizado para os experimentos de hipóxia. Foram inoculados $6 \cdot 10^5$ zoósporos $\cdot \text{mL}^{-1}$ em 400 mL de meio DM4 em condições de normóxia (70% saturação de O₂), a 28°C e pH 6,8. Após 6.5 h de crescimento adicionou-se 150 μM final de 2,2'-dipyridyl (Sigma[®]) e a cultura foi mantida nesta condição por mais 1 h. Foram retiradas alíquotas de células para isolamento de RNA total em T=0h (logo antes da adição de 2,2'-dipyridyl) e em T=1h (1 hora após a adição da droga). O experimento foi

realizado em triplicata e para as hibridizações dos microarranjos de cDNA utilizamos T=0h contra T=1h.

4.10 Experimento de Hipóxia com Geldanamicina

Também no mesmo biorreator, foram inoculados $6 \cdot 10^5$ zoósporos $\cdot \text{mL}^{-1}$ em 140 mL em meio DM4 em normóxia (70% saturação de O_2), a 28 °C e pH 6,8. Após 5,5 h de crescimento foi adicionado 2 μM de geldanamicina (Sigma). Após 1 hora nestas condições a concentração de oxigênio foi reduzida para 1% de saturação e foi mantida assim por uma hora. Em seguida foi retirada uma alíquota para isolamento de RNA total. Para a hibridação de microarranjos, usamos RNAs de células submetidas à 1 hora de hipóxia tratadas com geldanamicina, contra RNAs de células submetidas a 1 hora de hipóxia sem tratamento com geldanamicina (obtidos do experimento de hipóxia direta).

4.11 Extração de RNA total de *B. emersonii*

Para a extração de RNA, as amostras de células congeladas em freezer -70°C foram maceradas sob nitrogênio líquido e transferidas para tubos *ependorf* contendo 1 mL do reagente TriZol[®] (Invitrogen[®]), de forma que o volume final fosse de aproximadamente 1,2 mL. As amostras foram homogeneizadas por rotação lenta por pelo menos 5 minutos e centrifugadas a 12000g por 10 minutos a 4 °C para que os restos celulares se depositassem no fundo do tubo. Em seguida foi adicionado 200 μL de clorofórmio incubou-se o tubo por 2 a 3 minutos em temperatura ambiente, após leve inversão manual. Após nova centrifugação a 12000g por 15 minutos a fase aquosa superior foi separada e transferida para um tubo limpo e adicionou-se 500 μL de isopropanol para precipitação do RNA total. As amostras foram mantidas por 10 minutos em temperatura ambiente (25°C) e em seguida centrifugadas a 12000g por 10 minutos a 4°C. O RNA precipitado foi então lavado com etanol 70% e

secado em SpeedVac. Finalmente as amostras de RNA foram solubilizadas em 100 µL de água DEPEC e quantificadas por espectrofotometria direta (espectrofotômetro UV/Vis Ultrospec 2100 pro - Pharmacia®) e analisadas por eletroforese em gel de agarose em condições desnaturantes.

4.12 Microarranjos de cDNA

4.12.1 Síntese de cDNA e marcação com fluoróforo para hibridização dos microarranjos

Para a síntese e marcação de cDNAs foi utilizado o kit SuperScript™ Plus Indirect cDNA Labeling System (Invitrogen™ Life Technologies) com fluoróforos Alexa Fluor®.

Para a reação de síntese foram utilizados 10 µg de RNA total, 6 µL de oligo(dT) ancorado, 1 µL de solução de RNA Spike de controle para hibridização e água DEPC q.s.p 18 µL. Como se partiu de RNA total não foram adicionados à reação os hexâmeros aleatórios. Os tubos foram incubados por 5 minutos a 70°C e então transferidos para o gelo por pelo menos 1 minuto. Em seguida, adicionou-se a cada tubo 6 µL de 5X First-Strand buffer, 1.5 µL de 0,1 M DTT, 1.5 µL de dNTP mix, 1 µL de RNaseOUT™ (40 U/µL) e 2 µL de SuperScript™ III RT (400 U/µL). A reação foi realizada por 3 horas a 46°C. Após a hidrólise alcalina do RNA (15µL de 1N NaOH por 10 minutos a 70°C) a solução foi neutralizada pela adição e mistura de 15 µL de 1N HCl. A purificação foi feita em placas de filtração Multiscreen Millipore. Adicionou-se a cada tubo 120 µL de tampão de purificação e procedeu-se a centrifugação a 1.000 g, 1 minuto e 25°C. Após o descarte do filtrado, cada poço foi lavado 5 vezes com 200 µL de etanol 80% (as lavagens foram intercaladas por centrifugações a 1.000 g, por 1 minuto e 25°C, sendo a última centrifugação realizada a 3.500 rpm por 5 minutos). O cDNA foi obtido a partir de duas eluições com 45 µL de 10 mM Tris pH 8.0 a cada poço e centrifugação a 3.000 rpm por 5 minutos. Obtidas as soluções

purificadas dos cDNAs, essas foram transferidas para tubos *eppendorf* e evaporadas em SpeedVac.

Na etapa de marcação, os cDNAs secos foram primeiramente dissolvidos em 5 μ L de tampão de acoplamento. Sem incidência de luz direta, os fluoróforos foram então ressuspensos em mistura de 2 μ L de DMSO e 3 μ L de água DEPC por agitação em vórtex e imediatamente adicionados ao tubo *eppendorff* contendo os cDNAs correspondentes àquela marcação. Os tubos com as reações de marcação foram mantidos por 1,5 h à temperatura ambiente em recipiente protegido da luz. As amostras controle foram marcadas com o fluoróforo Alexa Fluor[®] 555 (fluoróforo Cy3; excitação a 555 nm), enquanto as amostras teste foram marcadas com o fluoróforo Alexa Fluor[®] 647 (fluoróforo Cy5; excitação a 647 nm). A etapa de purificação, seguinte à marcação, foi realizada segundo o mesmo protocolo usado na purificação dos cDNAs para marcação.

4.12.2 Hibridização e leitura da fluorescência das lâminas de microarranjos

Para a hibridização das lâminas de microarranjos com os cDNAs marcados, as amostras foram evaporadas no SpeedVac sob abrigo da luz e posteriormente cada par de amostras (controle e teste) foi dissolvida em 13,5 μ L de água DEPC. A essa solução foram adicionados outros 13,5 μ L de tampão de hibridização e 27 μ L de formamida deionizada, perfazendo um total de 54 μ L. Essa solução de hibridização foi aquecida a 92°C por 3 minutos em bloco termostaticado, rapidamente resfriada em gelo e centrifugada para aglutinação. Foi então dispensada sobre a lâmina de microarranjos (**Figura 6**) em forma de uma linha próxima a uma das colunas de sondas. Cuidadosamente uma lamínula foi colocada sobre a lâmina de forma a espalhar homogeneamente a solução por sobre todas as sondas do microarranjos. As lâminas de todas as condições de estudo sendo hibridizadas foram colocadas conjuntamente em uma câmara de hibridização de vidro (máximo de 5

lâminas por câmara), contendo um algodão umedecido com água deionizada, e essa, por sua vez, foi incubada por um período de no mínimo 16 horas a 42°C em forno de hibridização.

Passado o período de hibridização, as lâminas foram submetidas à lavagem manual com intervalos de agitação de 10 minutos em agitador orbital entre uma solução de lavagem e outra, utilizando sequencialmente as seguintes soluções: 1x SSC, 0,2% SDS a 55°C; 0,1x SSC, 0,2% SDS a 55°C e novamente 0,1x SSC, 0,2% SDS a 55°C. Após cada lavagem, as lâminas foram giradas em 180° para uma lavagem mais homogênea das mesmas. Por fim, foi feita uma última lavagem com solução 0,1x SSC, à temperatura ambiente (25°C) com agitação por 1 minuto. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas quatro vezes em água deionizada, e então secadas sob jato de nitrogênio ultra-puro.

A leitura das fluorescências das sondas foi realizada em escaner Generation III DNA Scanner (GE Healthcare) dedicado à leitura de lâminas de microarranjos segundo o protocolo padrão para obtenção de imagens. Foi feita, para cada lâmina, uma leitura com ganho de sinal da CCD de 750 V. Os arquivos referentes às imagens das lâminas foram então submetidos à extração dos dados de fluorescência para cada sonda dos microarranjos.

Figura 6: Desenho esquemático da lâmina de microarranjo de DNA. Os lados, esquerdo (E) e direito (D), da lâmina são idênticos, cada um contém 12 subarranjos compostos por 12 linhas e 32 colunas. A linha 12 de cada subarranjo contém um conjunto de 23 genes artificiais denominados Scorecard.

4.12.3 Quantificação da fluorescência emitida nos microarranjos e extração dos dados

As intensidades de fluorescência foram quantificadas pelo software *ArrayVision*® 6.0 (Image Research) através do *Median Artifact Removed Density* (MARMDens) que consiste em uma medida de densidade do sinal de fluorescência excluindo *pixels* que apresentem sinal acima ou abaixo de 4 desvios absolutos da mediana (MAD), proporcionando a exclusão de *pixels* que representam poeira ou artefatos de hibridização. Neste modelo, o *background* é quantificado como sendo uma moldura com largura de 2 pixels em torno do *spot* e a mediana do seu valor é subtraída do sinal bruto.

Para fins de controle de qualidade foi pedido ao programa que colocasse “flags” automaticamente, tanto para sondas quanto para o fundo, em que 20%, ou mais, dos *pixels* ultrapassassem os limites inferiores ou superiores de detecção.

Após o alinhamento dos *spots* e os cálculos dos dados, foi realizada uma verificação visual das imagens das lâminas em ambos os canais de fluorescência. Sondas suspeitas de terem o sinal influenciado por manchas ou riscos receberam também “flags” manuais. Os dados foram extraídos e gravados em arquivos texto (.txt) de planilhas do MS Excel (Microsoft®).

4.12.4 Normalização dos dados de Microarranjo

A normalização dos dados foi realizada para corrigir artefatos na incorporação dos fluoróforos e diferenças na intensidade de fluorescência entre os fluoróforos (Quackenbush, 2001; Yang *et al.*, 2002). Para isso, utilizamos o LOWESS – LOcally WEighted regreSSsion para ajustar os dados de expressão gênica, assumindo como hipótese que a maioria dos genes não deve apresentar diferença entre as duas condições. A função LOWESS está implementada no pacote estatístico R (www.r-project.org) e consiste em uma série de regressões lineares locais que se juntam para formar um ajuste global não-linear. A normalização foi feita no espaço $M \times S$ onde M é a razão da intensidade de fluorescência das duas medidas para cada spot [$M = \log_2(I_{\text{teste}}/I_{\text{referência}})$] e S representa a média da intensidade total do spot [$S = \log_2(I_{\text{teste}}/2 + I_{\text{referência}}/2)$] (Koide *et al.*, 2006).

4.12.5 Determinação dos genes diferencialmente expressos

Para a identificação de quais genes haviam sido diferencialmente expressos foram utilizadas ferramentas baseadas no teste estatístico HTself (<http://blasto.iq.usp.br/~rvencio/HTself>) (Vencio and Koide, 2005), que se vale da determinação de limites de corte dependentes da razão de intensidades de fluorescência em

hibridizações homotípicas (isto é, uma amostra hibridizada contra ela mesma) e do uso de métodos não paramétricos. A função de probabilidade de densidade (*pdf*) nula foi definida localmente para M em um intervalo de S, no espaço M x S, através do método de Estimador de Densidade Kernel do tipo gaussiano. Para tanto, utilizou-se como dados para análise a medida de densidade de fluorescência normalizada obtida na hibridização homotípica realizada com a amostra controle (RNA total do ponto de normóxia – C70). Após estimar a *pdf* nula, os limites de corte locais foram definidos como aqueles onde se encontravam 98% dos valores de M num determinado intervalo de S. O gráfico a seguir (**Figura 7**), do espaço M x S, apresenta os limites de corte definidos com os dados da hibridização homotípica realizada.

Figura 7: Hibridização self-self de Hipóxia Gradual e Direta. Gráfico do espaço M x S onde foram colocados os valores da medida de densidade de fluorescência normalizada obtida na hibridização homotípica (C70 vs C70). A linha contínua determina os limites de corte locais com a presença de 98% (p) dos pontos. $M = \log_2(C70/C70)$ e $S = \log_2(C70/2 + C70/2)$.

Em seguida, aplicamos estes limites de corte a todos os dados reais das demais hibridizações, para as três réplicas. Para cada sonda foi calculada a mediana do valor de M e a percentagem das réplicas que se encontravam em um de três grupos de expressão: Induzido, quando M se encontrava acima do limite de corte positivo naquele ponto de A; Reprimido, quando M se encontrava abaixo do limite de corte negativo naquele ponto de S; e Invariável, quando M se encontrava entre os limites positivo e negativo naquele ponto de

S. Foram considerados diferencialmente expressos aqueles genes nos quais pelo menos 66% das sondas (pelo menos duas em três) estivessem nos grupos Induzido ou Reprimido.

4.12.6 Agrupamento dos genes diferencialmente expressos segundo o perfil de expressão

Para realizar o agrupamento dos genes, de acordo com o perfil de expressão no experimento de hipóxia gradual, usando a medida de distância euclidiana, utilizou-se o algoritmo *K-means*, disponível como uma das ferramentas de análise de dados de microarranjos do programa SpotWhatR (<http://blasto.iq.usp.br/~tkoide/SpotWhat>) (Koide *et al.*, 2006).

K-means é um algoritmo iterativo de agrupamento, onde o número de grupos é uma das entradas do algoritmo e pode ser definido pelo usuário. Estes são representados por centróides, o centro do grupo. O algoritmo minimiza a somatória das distâncias de cada objeto ao centróide correspondente. Em cada interação, cada gene é designado para o centróide mais próximo e os novos centróides são computados com base na distribuição dos genes. Estes passos são repetidos até que não haja mais mobilidade dos genes entre os diferentes grupos.

Para realizar as análises de agrupamento, foi fornecido ao programa um arquivo contendo uma coluna de identificação dos clones (rotulada como ID) e as colunas correspondentes às condições experimentais de hipóxia gradual (C70; C35; C17,5; C5; C1; C0 e C70r), contendo os logaritmos da razão de expressão (mediana do valor de M). Com isso é possível visualizar agrupamentos semelhantes de perfis de expressão ao longo da série. O perfil de expressão dos genes diferencialmente expressos em hipóxia gradual, distribuídos em oito agrupamentos será apresentado na seção 5.1.4.

4.12.7 Determinação das categorias do Consórcio Gene Ontology mais representadas entre os genes diferencialmente expressos

A forma mais comum de análise de terminologia é a classificação de genes em categorias, das quais o esquema utilizado neste trabalho é o proposto pelo “*The Gene Ontology Consortium*” (GO). Os três princípios organizacionais do GO são: Função molecular (m), Processo biológico (b) e Componente celular (c). Um produto gênico tem uma ou mais funções moleculares e é usado em um ou mais processos biológicos e pode estar associado com um ou mais componentes celulares. Por exemplo, o produto gênico citocromo c pode ser descrito pelos seguintes termos: atividade transportadora de elétrons (F); fosforilação oxidativa e indução da morte celular (P); matriz mitocondrial e membrana mitocondrial interna (C).

Para a identificação de quais categorias do GO haviam sido mais representadas nos diferentes agrupamentos (*K*-means) e também nas diferentes condições de oxigênio estudadas, foi utilizado o teste estatístico BayGO (<http://blasto.iq.usp.br/~tkoide/BayGO>) (Vencio *et al.*, 2006).

O aplicativo BayGO foi desenvolvido com o objetivo de encontrar categorias funcionais (de acordo com a terminologia do Gene Ontology) altamente representadas em uma lista de genes diferencialmente expressos. Este programa recebe como dados de entrada uma tabela gene-para-GO e retorna uma tabela GO-para-gene. A tabela gene-para-GO foi montada após o BlastX das seqüências depositadas no microarranjo contra uma base de dados local. O programa resume os dados apresentando o número de genes em cada categoria funcional do GO e calcula a medida de associação entre ser diferencialmente expresso e pertencer a uma dada categoria GO. Esta medida de associação, denominada G, é calculada como descrito por (Goodman and Kruskal, 1954). Valores próximos a 1,0 indicam uma forte associação. Para determinar a significância estatística de uma dada

associação, ela é comparada com a associação G^* , obtida a partir de listas de genes simuladas ao acaso. Nós consideramos que uma categoria é altamente representada se o valor da probabilidade $P = \Pr(G^* > G)$ for menor ou igual a 0,05.

4.12.8 Depósito dos dados de microarranjo

Os dados de microarranjos apresentados nesta tese foram depositados na base de dados “Gene Expression Omnibus” (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) do NCBI e podem ser consultados através do número de acesso GSE17524 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE17524>).

4.13 Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo

Foi utilizado o método de RT-PCR quantitativo para a validação dos dados de microarranjo e para avaliar os perfis transcricionais de genes de interesse para este estudo, que não estão presentes nas lâminas de microarranjo. Foram desenhados oligonucleotídeos específicos para os genes selecionados (**Tabela 1**), utilizando-se o programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems). O programa tem como princípio a otimização do desenho de oligonucleotídeos para a reação de RT-PCR quantitativo (ou PCR em tempo real), considerando-se que o produto de PCR tenha entre 50 e 150 pb e sua temperatura de dissociação seja em torno de 80°C. As reações foram realizadas utilizando-se o *kit* SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) em o equipamento GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

O RNA total (5µg), previamente tratado com DNase, foi utilizado para síntese de cDNA, segundo as especificações do fabricante do *kit* SuperscriptII (Invitrogen). Os cDNAs obtidos foram diluídos para 125 µL com água *milliQ* tratada com DEPEC. Em seguida, foi realizada a reação de PCR quantitativo utilizando-se 5 µL de cDNA como molde, 1,6 µM de

oligonucleotídeos direto e reverso e 10 µL de SYBR[®] Green, sob os seguintes parâmetros: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. A especificidade dos produtos amplificados foi avaliada pela análise das curvas de dissociação geradas pelo aparelho.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de qRT-PCR para validação dos microarranjos e análise da expressão gênica de genes ausentes nas lâminas.

Clone ID	Anotação Putativa	Oligo direto (5' - 3')	Oligo reverso (5' - 3')
Validações dos microarranjos			
BeE60H26A05	Related to phosphatidylserine decarboxylase	GTTCCCGCTGACCAACAAGA	AGACGAGGCGCAGGATGA
BeE30N15A04	Eukaryotic translation initiation factor 3	TGCACCGCCATCATCGT	TCGGGCAGGAAGATGTTGA
BeE60H32G06	Trafficking protein particle complex subunit 5	GGTCCCAAAGGAAATGTAGC	CGTCGAGAATAGCATCCATG
BeE30N19D09	5-methyl tetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	GAGATCGGGCTCGACATCAT	CACCCGTGCTGCGTGAA
BeG120N15B05	S-adenosylmethionine synthetase	ACGGTCGAGTACAAGATGGACAA	AGTGCTGGGTCGAGATGACAA
BeE60N03G10	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	TCAACTTTTTGCGCATGGACTA	GCCATTTCAAGGCAGGTGAT
BeG30N15D05	carbonic anhydrase protein	ACAGATCGACCCCGAGTTCA	AACAGCAAATGGCGCAAGAC
BeG60N06G05	delta-9 fatty acid desaturase	CGCTCTACGGCGTTTCGA	CCCGGTGATCAAGTAGTAGATGAA
BeE120N03E01	D-lactate dehydrogenase	TCATCTGCCAGGACGTGTACA	AGCGTGTCATCTCCACGTACT
BeE120N37A02	Putative glutathione S-transferase	AGGTGCGAGTACCCGGACATG	GAAC TTGACCCAGTCCTTTTCG
BeE60H30A07	Heat shock protein 90 (Fragment)	GCGTCTTCATCATGGACAAC	GAGTCGACGATGCCCTTGAC
BeE60H06B09	Histone H2A	AACAAGTTGCTCGCCAGTGTT	GGCAGCAACTGAGGTGCCAAT
Genes ausentes nos microarranjos			
BeE90N03A12	6-phosphofructokinase subunit alpha	GCCACCATCTCCAACAACGT	GCCGACTGCTTCAGCTTGTC
BeE90D13G07	6-phosphofructokinase beta subunit	CGCCTTCGACACGTTTCGT	CGTACCACCACCCACAAC
BeG30N12D06	triosephosphate isomerase	ATCAACCACCTAATCCAAAAATGAC	AACTTGGTCGAGCCGTTGAG
BeCSAS379	pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase	CGCGATTGCCAAGGAGATT	CTTTTGGTAGGCAATGTCATTGTC
BeCSAS336	Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase)	GATCTTCATCAACTCGCTCAAGTC	GTCGGGACCACGATGATCTC

4.14 Análise de metabólitos por Eletroforese Capilar

4.14.1 Princípio do método

O processo de eletroforese é definido como a migração diferencial de íons por atração ou repulsão num campo elétrico. Em termos práticos um eletrodo positivo (ânodo) e um negativo (cátodo) são colocados numa solução contendo íons e, quando uma voltagem é aplicada pelos eletrodos, íons solúveis de diferentes cargas elétricas se moverão pela solução na direção do eletrodo de carga oposta. A Eletroforese Capilar consiste em aplicar a técnica de eletroforese em capilares, normalmente de 25 a 100 μm de diâmetro interno (d.i.).

4.14.2 Análise de metabólitos catiônicos por CE-MS

A separação dos metabólitos catiônicos foi realizada com o equipamento de eletroforese capilar P/ACE MDQ (Beckman Coulter, CA, USA). Para a detecção foi utilizado o espectrômetro de massas Thermo Finnigan, model LCD Ion Max Advanced with ESI source and Ion trap analyzer (MA, USA). A eletroforese foi realizada com capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies, AZ, USA) com 50 μm d. i. x 70 cm de comprimento total. Uma solução de ácido fórmico 1 M foi usada como eletrólito para a separação. Antes de cada injeção, o capilar foi pré-condicionado por 3 min com hidróxido de amônio 1 M, 2 min com água e finalmente 5 min com a solução eletrólito. As amostras foram injetadas a uma pressão de 0.5 psi por 5 s. O campo elétrico efetivo aplicado foi de $256 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ e a temperatura do capilar foi mantida a 25°C , com interface no modo “sheath-flow”. O líquido auxiliar, composto de 50/49,5/0.5 % (v/v) de água/metanol/ácido acético, foi injetado no CE-ESI-MS por uma bomba Gilson Pump Model 402 (MI, USA) num fluxo de $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, ao redor do sistema CE para promover uma conexão elétrica entre a extremidade do CE e o sistema MS para ajudar na dessolvatação, vaporização e resultar num aerosol estável. Os experimentos MS e MS/MS foram realizados no modo íon positivo e

uma voltagem de 4.5 kV do spray iônico foi aplicada em cada injeção via CE. Número de “microscans” = 3, duração dos “microscans” = 200 ms, temperatura do capilar = 275° C, voltagem do spray = 27 V, “tube lens offset” = - 8 V. A calibração do espectrômetro de massas foi realizada pela infusão direta pelo CE numa pressão de 10 psi com uma solução de L-histidina 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.14.3 Preparação dos extratos metabólicos

B. emersonii foi cultivada nas mesmas condições do experimento de hipóxia gradual (seção 4.6) e foram retiradas alíquotas de normóxia (C70), anóxia (C0) e reoxigenação (C70r). As células foram filtradas em papel 3mm (Whatman[®]), lavadas com água *milli-Q* e congeladas rapidamente em nitrogênio líquido. As células congeladas foram maceradas em cadinho sob nitrogênio líquido e o fino pó foi então transferido para um tubo falcon de 15 mL contendo 2 mL de metanol gelado (em freezer -20°C) para inativação de enzimas. Após incubação de 5 minutos em gelo, foram adicionados 2 mL de água *milli-Q* gelada (em refrigerador a 4°C), contendo 0,2 mM de imidazol e PIPES (piperazina-N,N'-bis-[ácido etanossulfônico]) como padrões internos. A mistura foi homogeneizada em vórtex e, em seguida, foram adicionados 3 mL de clorofórmio gelado (em freezer -20°C). A mistura foi novamente homogeneizada em vórtex para remover fosfolipídeos liberados de membranas. A emulsão resultante foi centrifugada a 12000 rpm, a 4°C por 15 minutos. Uma alíquota de 100 μL foi retirada do sobrenadante para posterior quantificação de proteínas totais. O restante do sobrenadante foi filtrado em tubos Ultrafree-MC filter, 5000 NMWL (Millipore, Bedford, MA, USA) para remover proteínas. A solução filtrada foi liofilizada em SpeedVac e guardada em freezer -80°C. No momento da análise as amostras foram solubilizadas em água *milli-Q* de forma que as concentrações de proteínas totais ficassem iguais.

4.14.4 Quantificação de proteínas totais – Método Bradford

Para a quantificação de proteínas totais nos extratos metabólicos utilizamos o reagente de Bradford (Sigma[®]). O protocolo consiste em adicionar num tubo de ensaio o volume desejado de amostra e tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7.5, para um volume final de 800 µL. Em seguida adiciona-se 200 µL do reagente de Bradford e incuba-se a 25°C por 5 min, após homogeneização em vórtex.

Inicialmente foi feita uma curva-padrão utilizando soro bovino fetal (BSA), a partir da qual foram calculadas as concentrações de proteínas dos extratos metabólicos.

4.15 Transformação de *B. emersonii* por *Agrobacterium tumefaciens*

4.15.1 Construção do Vetor Binário pBINPLUS-Hph

O fragmento de 2,4 kpb proveniente do plasmídeo pCSN43 (Staben *et al.*, 1989) (**Figura 8A**), contendo o gene de resistência a higromicina B de *Escherichia coli*, (*higB'*) que codifica a enzima higromicina fosfotransferase (Hph), foi cortado com a enzima SalI e inserido no interior da seqüência do T-DNA presente no vetor binário pBINPLUS (van Engelen *et al.*, 1995) (**Figura 8B**).

Figura 8: Plasmídeos utilizados na construção do vetor binário pBINPLUS-Hph. **A:** pCSN43 (Staben *et al.*, 1989). **B:** pBINPLUS (van Engelen *et al.*, 1995).

4.15.2 Protocolo de transformação

Condições de cultivo para *Agrobacterium tumefaciens*

Utilizamos a cepa EHA105 de *A. tumefaciens*, a qual possui um plasmídeo Ti pTiEHA105. Esse plasmídeo possui uma deleção completa do T-DNA, além de possuir os genes *vir* supervirulentos do tipo succinamopina (Hood *et al.*, 1993). Primeiramente ela é transformada com o vetor binário pBINPLUS-*hph* por eletroporação e selecionada em placas de LB-ágar contendo 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de Canamicina.

Cultiva-se uma colônia isolada overnight a 28 °C em 5 mL de meio mínimo MM (seção 4.2), contendo 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de Canamicina. Em seguida, 1 mL da cultura é lavada duas vezes com 1 mL de meio de indução IM (seção 4.2), 10 vezes diluída no mesmo meio (IM) e incubada a 28 °C sob agitação por cerca de 5 horas até uma DO_{600} de aproximadamente 0,25. As células são então lavadas duas vezes com 1 mL de água *milliQ* estéril e ressuspensas no mesmo volume.

Co-cultivo e seleção dos transformantes

Aproximadamente $5 \cdot 10^{-7}$ zoósporos de *B. emersonii* foram inoculados em 50 mL de meio DM4 (seção 4.2) e incubados a 28 °C por 1,5 horas sob agitação, até o início da germinação. As células foram coletadas por centrifugação (12000 rpm), lavadas com água *milliQ* estéril uma vez e ressuspensas com a suspensão de *A. tumefaciens* preparada anteriormente. A mistura foi dividida em duas alíquotas e estas foram aplicadas uniformemente sob duas placas de IM-ágar (seção 4.2). O Co-cultivo foi realizado a 19°C por 24 horas.

Após o co-cultivo, a superfície das placas foi raspada com o auxílio de uma lâmina de vidro estéril, e todo o conteúdo foi transferido para placas de PYG (seção 4.2) contendo $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ do antibiótico cefotaxime (Sigma) para matar *A. tumefaciens*, e $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de higromicina B para selecionar transformantes resistentes de *B. emersonii*. As placas foram incubadas a 28°C até ocorrer esporulação e os zoósporos resistentes foram mantidos e selecionados 7 vezes em placas PYG contendo $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de higromicina B. Como controle negativo utilizamos o vetor binário pBINPLUS sem a inserção do cassete de resistência contendo Hph. A **Figura 9**, a seguir, ilustra o esquema geral do protocolo de transformação de *B. emersonii*.

Figura 9: Esquema do protocolo de transformação de *B. emersonii* mediada por *A. tumefaciens*.

4.15.3 Extração rápida de DNA genômico de zoósporos

Os zoósporos resistentes foram coletados das placas de PYG com 1,5 mL de água *milliQ* e foram centrifugados em tubo *ependorf* a 12000g por 5 minutos a 25°C. Após duas lavagens com 1 mL de água *milliQ* foram adicionados 700 µL de tampão de lise (Tris-Cl 50 mM, EDTA 10 mM, SDS 1%, pH 7.5), seguido de inversão leve por 30 minutos a 25°C. Em seguida foram feitas extrações sucessivas com fenol saturado pH 7.5, fenol saturado pH 7,5/clorofórmio (1/1; v/v) e clorofórmio puro. O DNA genômico foi precipitado adicionando-se acetato de sódio 3M na proporção 1/10 (v/v) e isopropanol gelado na

proporção 1/1 (v/v). Após a 12000g por 20 minutos a 4°C o DNA foi lavado com etanol 70% gelado e seco em SpeedVac. O DNA precipitado e seco foi então dissolvido em 50 µL de TE/RNase (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, RNase A 20 µg·mL⁻¹, pH 8.0) e guardado a -20°C.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Carência de oxigênio: Hipóxia Gradual e Direta

5.1.1 Aspectos morfológicos

Como pode ser observado na **Figura 10**, as células de *B. emersonii* adquirem uma forma alongada anormal quando a concentração de oxigênio dissolvido é diminuída nos experimentos de hipóxia gradual. Apesar deste alongamento, as células crescem volumetricamente mesmo durante hipóxia e, após a reoxigenação, elas parecem começar a recuperar a forma ovalada normal. Como um teste de viabilidade celular a cultura foi incubada a 19°C em normóxia, por mais 12 h após o término do experimento de hipóxia gradual. Foi observado que a grande maioria das células recuperou a morfologia e crescimento normal e também pôde ser observada a formação e liberação de zoósporos, indicando que as células permanecem viáveis e funcionais.

Figura 10: Alterações morfológicas em células de *B. emersonii* submetidas à hipóxia gradual. As amostras para microscopia óptica foram retiradas em cada etapa do experimento de hipóxia gradual (ver seta e pontas de seta na **Figura 4** pag. 26). As células crescem normalmente em normóxia (**A**) e 35% sat. O₂ (**B**), mas começam a adquirir uma forma alongada anormal à medida que a concentração de oxigênio dissolvido é diminuída. (**C**, **D**, **E** e **F**). Após reoxigenação (**G**), as células parecem começar a recuperar a forma ovalada normal. Como teste de viabilidade celular a cultura foi incubada a 19°C em normóxia, por mais 12 h após o término do experimento de hipóxia gradual. A grande maioria das células recuperou a morfologia e crescimento normal (**H** e **I**) e também pôde ser observada a formação e liberação de zoósporos (seta em **I**).

5.1.2 Captação de glicose

Foram realizadas medidas de concentração de glicose no meio extracelular (seção 4.7) dos experimentos de hipóxia gradual. Como pode ser observado na **Figura 11**, a captação de glicose do meio aumenta ligeiramente nas primeiras 6.5 h de normóxia, mas passa a crescer consideravelmente conforme o oxigênio é diminuído e cresce ainda mais

rapidamente quando as células são reoxigenadas. Este resultado corrobora o perfil transcricional de indução que foi observado para a maioria dos genes de via glicolítica e para o transportador de hexose HXT-14 (seção 5.1.7). Durante a reoxigenação, a captação de glicose aumentou mais rapidamente provavelmente porque altos níveis de enzimas glicolíticas estavam presentes devido à regulação transcricional. Assim, quando o oxigênio se tornou livremente disponível, a fosforilação oxidativa e o ciclo de Krebs puderam funcionar mais rapidamente, oxidando os carbonos provenientes da via glicolítica.

Não se pode negar que o aumento da captação de glicose também pode ser um efeito do crescimento celular durante o experimento. Entretanto, fica claro que a taxa de aumento da captação, representada pela inflexão da curva média na **Figura 11**, muda consideravelmente quando se inicia a diminuição da concentração de oxigênio dissolvido (após 6.5 h de cultivo). Isto significa que a carência de oxigênio exerce influencia sobre a captação de glicose em *B. emersonii*, provavelmente devido às alterações metabólicas promovidas pela regulação transcricional.

Figura 11: Efeito da disponibilidade de oxigênio na captação de glicose em hipóxia gradual. A captação de glicose do meio aumentou levemente durante as primeiras 6.5 horas de cultivo em normóxia, mas aumentou consideravelmente durante a carência de oxigênio e ainda mais rapidamente durante a reoxigenação. As quantificações foram realizadas em três experimentos independentes.

5.1.3 Genes diferencialmente expressos

No experimento de hipóxia gradual (seção 4.6) nós comparamos as populações de transcritos de células na condição controle (C70) com células nas demais concentrações de oxigênio (C35, C17.5, C5, C1, C0 e C70r). Dentre os 3773 ESTs analisados, 3169 (84.0%) se mostraram expressos nos microarranjos e 366 (9.7%) foram classificados como diferencialmente expressos em hipóxia, anóxia e reoxigenação.

Como no experimento de hipóxia gradual a concentração de oxigênio é diminuída gradativamente, as células podem ter sofrido um efeito de aclimação, no que diz respeito à regulação da expressão gênica. Por esta razão, decidimos realizar o experimento de hipóxia direta (seção 4.8), no qual a concentração de oxigênio é diminuída diretamente de normóxia

(70% sat. O₂) para hipóxia (1% sat. O₂) e 5 horas após restauração da normóxia. Neste experimento, dentre os 3773 ESTs analisados, 3379 (88.0%) se mostraram expressos nos microarranjos e 456 (12.1%) foram classificados como diferencialmente expressos em hipóxia e reoxigenação.

De fato, o experimento de hipóxia direta enriqueceu os dados de hipóxia gradual com 284 novos genes diferencialmente expressos, além dos 172 genes sobrepostos (**Figura 12**), totalizando 650 genes diferencialmente expressos em ambos os experimentos **Tabela S 1**.

Figura 12: Genes diferencialmente expressos em Hipóxia Gradual e Hipóxia Direta. A superposição dos círculos mostra o número de genes comuns aos dois processos.

5.1.4 Agrupamento dos genes diferencialmente expressos segundo os perfis de expressão

A fim de se obter uma visão geral do perfil de expressão dos genes diferencialmente expressos em hipóxia gradual e direta, procedeu-se o seu agrupamento segundo o algoritmo K-means (seção 4.12.6). Foram obtidos 8 agrupamentos para cada experimento (**Figura 13**).

Figura 13: Agrupamento dos genes diferencialmente expressos em Hipóxia Gradual (A) e Hipóxia Direta (B). As abscissas indicam as condições de oxigênio dissolvido nos experimentos e as ordenadas indicam o $\log_2$ da razão de expressão da condição teste sobre a referência (C70).

Estes agrupamentos permitiram a identificação e separação dos genes realmente afetados pela concentração de oxigênio dissolvido, e não por outros fatores como crescimento celular e modificações nutricionais durante o experimento. Para isso, levamos em consideração somente os genes que apresentaram um perfil de indução ou repressão durante a carência de oxigênio, seguido de recuperação da expressão (ou tendência à recuperação) aos níveis normais, quando as células foram reoxigenadas.

Desta maneira, dos 650 genes diferencialmente expressos em ambos os experimentos, 534 foram considerados afetados (direta ou indiretamente) pela concentração de oxigênio dissolvido, devido aos seus perfis de expressão. Ao todo 116 genes foram então desconsiderados por não apresentarem perfis de expressão marcante, no que diz respeito à hipóxia e reoxigenação. Todos os 650 genes diferencialmente expressos podem ser consultados no Material Suplementar (**Tabela S 1**).

5.1.5 Determinação das categorias do Consórcio Gene Ontology (GO) mais representadas entre os genes diferencialmente expressos em hipóxia

Realizamos uma análise utilizando o aplicativo BayGO (<http://blasto.iq.usp.br/~tkoide/BayGO>) (Vencio *et al.*, 2006), para determinar de maneira estatisticamente confiável as categorias do Consórcio Gene Ontology (GO) mais representadas entre os genes com perfis induzidos ou reprimidos em hipóxia gradual e/ou direta (**Tabela 2**).

Tabela 2: Categorias do Gene Ontology (GO) mais representadas entre os genes com perfis induzidos e reprimidos em hipóxia gradual e direta. As categorias são classificadas em três grupos: Função molecular (m), Processo biológico (b) e Componente celular (c). As categorias foram consideradas altamente representadas quando possuíam valor da probabilidade P menor ou igual a 0.05.

Induzidos		
P	ID	Descrição
0	GO:0005975	(b)carbohydrate metabolism
0.01	GO:0016868	(m)intramolecular transferase activity, phosphotransferases
0.01	GO:0015976	(b)carbon utilization
0.03	GO:0004733	(b)pyridoxine biosynthesis
0.03	GO:0004034	(m)aldose 1-epimerase activity
0.03	GO:0006807	(b)nitrogen compound metabolism
0.04	GO:0005198	(m)structural molecule activity
0.04	GO:0008061	(m)chitin binding
0.04	GO:0046872	(m)metal ion binding
0.04	GO:0000724	(b)double-strand break repair via homologous recombination
0.04	GO:0031966	(c)mitochondrial membrane
0.04	GO:0004301	(m)epoxide hydrolase activity
0.05	GO:0009116	(b)nucleoside metabolism
0.05	GO:0006096	(b)glycolysis
0.05	GO:0006032	(b)chitin catabolism
Reprimidos		
P	ID	Descrição
0	GO:0006457	(b)protein folding
0.01	GO:0051082	(m)unfolded protein binding
0.02	GO:0005739	(c)mitochondrion
0.02	GO:0006520	(b)amino acid metabolism
0.02	GO:0006626	(b)protein targeting to mitochondrion
0.03	GO:0005515	(m)protein binding
0.03	GO:0004300	(m)enoyl-CoA hydratase activity
0.04	GO:0006857	(b)oligopeptide transport
0.05	GO:0005524	(m)ATP binding
0.05	GO:0004070	(m)aspartate carbamoyltransferase activity

A análise utilizando BayGO identifica categorias funcionais estatisticamente bem representadas num grupo de genes diferencialmente expressos, em relação ao universo de

genes em estudo. Deste modo, podemos inferir com mais confiabilidade que tais categorias são realmente importantes para a resposta celular ao estresse em questão.

Com base neste raciocínio, pudemos observar que as categorias mais importantes entre os genes com perfis induzidos estão relacionadas a: metabolismo de carboidratos (*carbohydrate metabolism; glycolysis; carbon utilization*), metabolismo de quitina (*chitin catabolism; chitin binding*), estrutura celular (*structural molecule activity*), homeostase redox (*pyridoxine biosynthesis*) e metabolismo de ácidos nucleicos (*nucleoside metabolism*). Dentre os genes com perfis reprimidos, as categorias mais relevantes estão principalmente relacionadas a: processos dispendiosos em energia, como enovelamento de proteínas (*protein folding; unfolded protein binding*), metabolismo de aminoácidos (*amino acid metabolism*), transporte por membrana (*oligopeptide transport; protein targeting to mitochondrion*), além de processos moleculares dependentes de ligação a ATP (*ATP binding*).

5.1.6 Análise da expressão de genes ausentes nos microarranjos por qRT-PCR

Decidimos avaliar por qRT-PCR a expressão de alguns genes de interesse no experimento de hipóxia gradual., que não estavam depositados nos microarranjos. As sequências dos oligonucleotídeos utilizados estão na Tabela 1 (seção 4.13). Como normalizador, foi utilizado o gene BeE60H30A07, que codifica uma “heat shock protein 90 kDa”, não afetado por hipóxia gradual nos microarranjos.

Os genes analisados codificam enzimas que fazem parte da via glicolítica de *B. emersonii* e, como podemos observar na Figura 14, todos eles foram significativamente induzidos em condições de hipóxia.

Figura 14: Análise da expressão por qRT-PCR de genes ausentes nos microarranjos de cDNA. Na ordenada estão mostradas as razões de expressão e na abscissa as condições de oxigênio dissolvido. As barras verticais representam os desvios-padrão das análises realizadas em duplicata biológica.

5.1.7 Análise dos genes afetados pela concentração de oxigênio dissolvido

Por razões práticas, os 534 genes afetados por hipóxia foram classificados de acordo com o comportamento de indução ou repressão quando a concentração de oxigênio diminui. Deste modo, 220 foram considerados induzidos e 314 reprimidos, pela carência de oxigênio. A **Figura 15**, a seguir, ilustra a distribuição destes 534 genes classificados manualmente em categorias funcionais.

Figura 15: Genes com perfis induzidos ou reprimidos em hipóxia gradual e/ou direta, distribuídos em categorias funcionais de acordo com o GO.

Podemos notar na **Figura 15** que certos processos biológicos merecem destaque, pois exibem certa predominância de genes com perfis induzidos ou reprimidos em carência de oxigênio. Processos como metabolismo de aminoácidos, enovelamento e modificação de proteínas, estrutura de cromatina, transporte, proteínas ribossômicas/tradução e transcrição/processamento de RNA apresentaram maior porcentagem de genes com perfil reprimido, sugerindo que tais processos devem estar inibidos quando há privação de oxigênio. Em contraste, processos como ciclo celular, parede celular, metabolismo energético, metabolismo de lipídeos e estrutura celular/microtúbulos apresentaram a maior parte de seus genes com perfil induzido.

A **Tabela 3**, a seguir, mostra os genes afetados por hipóxia gradual e/ou direta, que apresentam alguma similaridade com sequências depositadas no GenBank e/ou SwissProt. A lista completa, contendo os *No Matches* e proteínas hipotéticas sem função conhecida, assim como os genes sem perfis de expressão marcantes, pode ser consultada no Material Suplementar (**Tabela S 1**).

Tabela 3: Lista de genes afetados por hipóxia gradual e/ou direta obtidos pela técnica de microarranjo de cDNA. Os valores representam a razão de expressão (teste/C70). As setas indicam os perfis de indução (para cima) ou repressão (para baixo).

Clone ID	SwissProt	Anotação	Perfil Geral	Hipóxia Direta				Hipóxia Gradual							
				C1_1h	C1_5h	C70r_1h	Kmeans HD	C70	C35	C17.5	C5	C1	C0	C70r	Kmeans HG
Metabolismo de Aminoácidos															
BeZSPN04C10	Q9P7L5	ornithine-oxo-acid transaminase, putative	↓	0.7	0.6	1.2	1								
BeE120N30H05	Q7RV8	Arginase	↓	0.5	0.9	1.1	1	1.1	1.1	0.8	0.6	0.4	0.4	1.1	1
BeE30N08H12	P9497	2-isopropylmalate synthase	↓	0.8	0.9	1.4	1	1.0	1.2	1.0	1.0	0.7	0.7	1.2	2
BeE30N15B02		cysteine synthase	↓	0.8	0.7	1.1	1		0.9	1.1	1.1		0.5	0.7	2
BeE30N19D09	Q7VVU3	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	↓	0.2	0.6	2.1	2	1.0	0.4	0.4	0.3	0.1	0.1	0.4	8
BeE60H28B12	Q96VZ6	Acetolactate synthase Ilv2	↓	0.4	0.5	2.9	1	1.0	1.2	1.5	1.3	0.3	0.3	1.5	1
BeE60N07B05	Q9NAE2	Probable urocanate hydratase	↓	0.6	0.8	0.9	1	1.1	1.1	1.0	0.9	0.6	0.8	0.9	2
BeE90D12G12	P48611	6-pyruvoyl tetrahdvdropterin synthase	↓	1.0	0.7	1.4	1	1.0	1.1	0.9	0.8	0.6	1.3	0.6	5

BeG120N15B05	Q12642	S-adenosylmethionine synthetase (Fragment)	↓	0.3				1.0	0.5	0.5	0.5	0.1	0.2	0.6	8
BeZSPN16H02	P1869	Aspartokinase	↓	0.6	0.9	1.2	1	0.9	0.9	1.0	0.9	0.5	0.5	1.4	1
BeG30N04E01	Q8JHX9	Glutamate dehydrogenase 3	↓					1.2	0.8		0.5		0.6	0.8	2
BeZSPN14H05		histidinol phosphate aminotransferase	↓	0.7	1.0	1.4	1	1.0	0.7	0.7	0.7	0.3	0.2	0.7	1
BeE60C11F11	P22768	Argininosuccinate synthase	↑	0.9	1.6	1.1	3	1.0	1.8	1.2	1.2	1.6	1.7	0.4	6
BeG90N02C03	P78568	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	↑	1.7	2.1	1.2	3	1.1	1.1	0.9	1.0	1.7	2.1	1.0	6
BeG90N10B05	Q8KCK4	Glutamine synthetase	↑	1.2	1.7	1.3	3	1.0	1.1	0.9	1.2	1.3	1.9	1.0	6
Ciclo Celular															
BeG30N12D04	Q2533	Cyclin-dependent kinases regulatory subunit	↓	0.7	0.9	1.1	1								
BeE120N32A08	P7862	Septin B	↑	1.0	1.8	1.2	3	0.9	1.4	1.0	1.1	1.1	1.4	0.8	6
BeE60N18D05		cyclin-dependent protein kinase PHOB	↑					1.1	1.1	0.9	1.1	1.4	1.6	1.1	6
BeG30N08C06	Q9C1M3	Septin	↑					1.0	1.1	1.0	0.9	1.2	1.7	1.0	6
BeZSPN15D07	P34991	S-phase kinase-associated protein 1A	↑					1.0	1.0	1.0	1.2	1.5	1.4	1.0	6
Parede Celular															
BeE60N10E05	Q99447	Ethanolamine-phosphate cytidyllyltransferase	↓					1.0	1.1	0.8	0.9	0.6	0.6	0.9	2
BeG90N10G04	P87073	Chitin synthase 1	↓					1.2	0.8	0.8	0.5	0.6	0.6	0.7	2
BeE90N16E04	Q7X5L8	Chitinase Chi80 precursor	↑	1.3	1.5	1.0	3								
BeG90N06B05	Q96VN	Chitin deacetylase	↑	1.4		0.1									
BeZSPN18C06		proteophosphoglycan glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	↑	1.2	1.3	1.0	3								
BeE60N03F03			↑	1.8	1.2	0.8	5	1.0	1.1	1.1	1.2	1.5	2.1	1.0	6
BeZSPN18H03	Q9SQF7	Chitinase	↑	1.4	1.3	1.1	3	1.0	1.2	1.1	1.2	1.3	1.5	1.2	6
Estrutura de Cromatina															
BeG30N17G05	Q1469	programmed cell death 11	↓	0.9	0.7	0.9	4								
BeE120N03F12	Q9JM53	Programmed cell death protein 8, mitochondr	↓					1.0	0.9	0.8	0.8	0.7	0.7	0.8	2
BeE30N02C10	Q9HDN1	Histone H3	↓					1.0	1.0	1.0	0.9	0.8	0.7	1.0	2
BeE60H06B09	Q07135	Histone H2A	↓					1.0	1.0	1.1	0.9	0.8	0.6	1.1	2
BeNSVP07G09	Q8J1K2	Histone H2B	↓					0.8	1.0	1.0	0.9	0.7	0.5	1.1	2
Reparo de DNA															
BeE30N07D04	O13768	Putative dna repair helicase	↑	2.0	1.6	1.0	5								
Replicação de DNA															
BeE60H16G11		Origin recognition complex, subunit 5 (ISS)	↑	4.3	3.0	0.5	6	0.9	0.9	0.9	1.0	3.9	12.6	0.8	3
BeG120N03B10	Q8R323	Replication factor C subunit 3	↑	3.5	2.0	1.0	6				1.1	2.2	6.5		3
Metabolismo Energético															
BeE90N17C02-1	Q83PF	deoxyribose-phosphate aldolase [Escherichia coli]	↓	0.6		0.7									
BeG120N19C09		6-phosphogluconolactonase [Laccaria bicolor phosphoenolpyruvate carboxykinase [Emericella nidu	↓	0.5		0.9									
BeNSVP12G02			↓	0.7	0.9	1.0	1								
BeZSPN09E08	Q7Z8B6	H(+)-ATPase [Glomus mosseae]	↓	1.0	0.6	0.6	4								
BeE120N27B02	P5625	Cytochrome c	↓	0.6	0.7	1.0	1	1.0	0.9	0.9	0.9	0.5	0.3	1.4	1
BeE30N04B04	Q9UVH9	Fox2 protein	↓	0.4	0.6	1.8	1	1.0	0.9	1.1	1.4	0.6	0.6	2.2	2
BeE60H29B11		ATP synthase epsilon chain domain containing protein	↓	0.7	0.8	1.2	1	0.9	1.0	1.0	0.9	0.7	0.6	0.8	2
BeG30N08D01	Q9Y3D8	Adenylate kinase isoenzyme 6	↓	0.9	0.6	0.9	4	1.0	1.0	1.0	0.9	0.6	0.6	1.1	2
BeE120N27B03	Q03015	NADH-ubiquinone oxidoreductase 12 kDa subunit	↓					1.1	0.8	0.9	0.9	0.8	0.7	1.0	2
BeE30N04H06	Q9Z2K9	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	↓					1.1	1.3	1.2	1.1	0.6	0.8	1.0	2
BeE30N05E04	Q7Z940	Succinyl-CoA synthetase, beta subunit	↓					1.1	1.1	0.9	0.8	0.7	0.7	1.0	2
BeE60N08H02	O13350	ATP synthase D chain, mitochondrial	↓					1.0	1.1	1.0	1.0	0.7	0.8	0.9	2

BeG120N03B06	Q9UWE0	Dihydrolipoamide succinyltransferase	↓					1.0	0.9	0.8	0.7	0.4	0.5	0.7	1
BeG120N07H08	O74699	Aconitase	↓					1.0	0.9	0.8	0.9	1.0	0.8	1.4	2
BeG90N01G09	Q7NJZ3	Ribose 5-phosphate epimerase	↓					0.8	0.7	0.8	0.8	0.6	0.4	0.8	2
BeG90N12C05		glutaryl-Coenzyme A dehydrogenase isoform a	↓					1.0	1.0	0.9	0.7	0.6	0.4	0.9	2
BeE60H08E04	Q9A212	Quinone oxidoreductase	↑	1.2	1.5	1.0	3								
BeE60H17D05	P53659	Vacuolar ATP synthase subunit d	↑	1.5	1.4	1.0	3								
BeE60H32F11		aldose 1-epimerase, putative [Aspergillus clavatus	↑	1.7	1.2	0.9	5								
BeE60N02F01		UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	↑	1.5	1.9	1.0	3								
BeE60N17G05	Q9YHT2	succinate dehydrogenase complex, subunit B	↑	2.1	1.6	0.9	5								
BeE90N05B09	Q8GUB3	Putative vacuolar ATPase subunit H	↑	1.6	1.4	1.2	3								
BeG30N12E07	Q9P8D2	Cytochrome c oxidase subunit V	↑	1.4	1.2	0.9	5								
BeG60N14B08	Q86AV6	citrate synthase [Dictyostelium discoideum	↑		1.7	1.1									
BeG90N01D12	P4157	6-phosphogluconate dehydrogenase	↑	1.0	2.2	1.1	3								
BeG90N05E08	Q9171	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta su	↑	1.2	1.4	1.0	3								
BeE120N03E01	Q8ZN3	D-lactate dehydrogenase	↑	5.0	4.0	0.6	6	1.0	1.0	0.5	1.2	4.8	4.2	0.4	3
BeE30N02H06	Q9P4V2	Phosphoacetylglucosamine mutase	↑	2.3	1.6	0.9	5		1.1	0.9	1.3	2.0	2.2	0.9	6
BeE30N15D01		NADP-dependent alcohol dehydrogenase	↑	1.6	2.9	1.4	3	1.0	1.0	1.3	1.3	2.5	3.7	1.2	7
BeE30N21H07	P6738	Glycogen phosphorylase	↑	1.3	2.0	1.0	3	1.1	1.1	0.9	1.2	1.4	1.7	0.7	6
BeE60H08B07	O74478	phosphoglucomutase	↑	1.5	1.4	1.0	3	1.0	1.3	0.9	1.1	1.2	1.6	1.1	6
BeE60N02G08		aldose 1-epimerase, putative	↑	3.1	1.8	0.8	6	1.1	1.2	1.2	1.3	2.4	2.4	0.7	6
BeE60N05D05	Q8EBH2	Transaldolase	↑	1.5	1.5	1.0	3	1.1	1.0	1.0	1.2	1.6	3.1	0.8	6
BeE60N10B03		vacuolar ATP synthase subunit c	↑	2.1	1.3	0.9	5	0.9	1.2	1.1	1.4	2.3	2.2	0.8	6
BeE90N15E12		glycogen phosphorylase	↑	1.5		1.2		1.1	1.0	0.9	1.2	1.7	2.1	0.8	6
BeG120N01F06	O57656	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+]	↑	1.2	1.5	0.9	3	1.1	1.1	1.0	0.9	1.2	1.7	0.8	6
BeG30N15D05	Q8Y2Q8	carbonic anhydrase protein	↑	5.5	2.8	0.5	6		1.8	1.1	3.9	5.4	3.4	0.3	7
BeG90N11A02	Q9WD9	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	↑	1.9	2.4	1.2	3	1.0	1.4	1.3	2.0	2.3	2.6	0.9	7
BeG90N18E08	Q8X97	Probable ATP-citrate synthase subunit 1	↑	1.7	1.1	0.4	5	1.0	1.3	1.1	1.2	1.3	2.0	0.4	6
BeE120N26G05	P31413	Vacuolar ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit	↑					1.0	1.1	1.1	1.3	1.5	1.4	1.0	6
BeG120N06H01		similar to phosphoglucomutase 2	↑					1.0	1.3	0.9	1.1	1.3	1.6	1.1	6
BeG90N03E03	P42894	Enolase	↑					1.0	1.2	1.1	1.4	1.6	1.9	0.7	6
BeG90N13C04		phosphoglucose isomerase	↑						1.1	1.2		1.3	1.3		6
Metabolismo de Lipídeos															
BeE60C35H09	Q8BH95	Enoyl coenzyme A hydratase	↓	0.8	0.6	0.6	4								
BeG90N21B12		Enoyl-CoA hydratase (31.2 kD) [Caenorhabditis eleg	↓	0.9	0.5	0.6	4								
BeE30N02B11		fatty acid-2 hydroxylase [Laccaria bicolor	↑	2.2	1.1	0.9	5								
BeE60C25C06	Q88LT3	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	↑		1.1	0.3									
BeE60N03A03		C-5 sterol desaturase	↑	1.7											
BeG90N07B07		leukotriene A4 hydrolase	↑	1.6	1.1	0.7	5								
BeE120N30F01	P5345	C-4 methyl sterol oxidase	↑	1.6	1.2	0.8	5	1.1	1.0	1.1	1.3	1.5	1.4	0.9	6
BeE60H26A05	Q872A4	Related to phosphatidylserine decarboxylase	↑	5.0	2.6	1.0	6	0.9	1.8	2.5	6.1	15.8	12.6	2.7	7
BeG120N16E05	P4398	Fatty acid synthase subunit alpha	↑	1.5	1.7	0.4	5	1.0	1.3	1.1	1.1	1.8	2.0	0.5	6
BeG60N06G05	P7978	Delta-9 fatty acid desaturase	↑	3.1	1.9	0.3	6	1.0	1.9	0.7	1.4	3.8	4.4	0.2	3
BeE60C08F07		Deoxyhypusine hydroxylase (Deoxyhypusine monooxygenase)	↑					0.9		1.0	1.1	1.1	1.4	1.2	6
BeE60N03G10		cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	↑					1.1	1.8	1.5	3.8	8.9	5.7	2.0	7
BeZSPN13B04		1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase (AtaAp)	↑					0.9	0.8	1.1	1.0	1.2	1.5	0.9	6
BeE30N04A05		delta 4-(E)-sphingolipid desaturase	↑					1.1	1.0	0.8	0.8	1.1	1.9	0.5	5

Metabolismo de Ácidos Nucleicos																	
BeE30N17G08	Q7ZV49	hypoxanthine phosphoribosyltransferase I	↓	1.0	0.5	1.5	1										
BeE30N18D07		ATP phosphoribosyltransferase	↓	0.7	0.9	1.1	1										
BeG60N16H02	Q9BLT3	Nucleoside hydrolase	↓	0.6	0.5	0.9	1										
BeG90N09B12	Q27124	ribonucleotide reductase small subunit	↓	0.7	0.7	1.0	1										
BeG90N12C08		similar to Endonuclease G like 1 (Endo G like)	↓	0.5													
BeG30N12D07	O93937	PyrABCN	↓	0.7	1.2	2.0	1	1.0	0.7	0.4	0.7	0.6	0.8	0.9	2		
BeG30N15B12		URA1 protein	↓	0.9	1.5	1.9	3	1.0	0.8	0.7	0.8	0.7	0.9	1.0	2		
BeG30N20G08	Q8NIH8	Nuclease Le3	↓	1.1	0.6	0.7	4	1.1	0.9	1.0	0.6	0.9	0.6	0.5	5		
BeG60N19B01	P38625	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	↓	0.4	1.1	1.5	1	1.1	0.7	0.8	0.7	0.7	0.6	1.0	2		
BeE60C24G08	Q8XRK0	TDP-glucose-4,6-dehydratase-related protein	↓					1.0	0.8	0.8	0.7	0.7	0.8	0.8	2		
BeG120N09C02	Q8NIH8	Nuclease Le3	↓					1.2	1.3	1.0	0.9	0.6	0.7	1.0	2		
BeG90N18B04		Adsl-prov protein	↓					1.0	0.7		0.5		0.6	0.8	2		
BeG60N01B06	Q84P58	Adenosine kinase-like protein probable inosine-5\'-monophosphate dehydrogenase	↓					1.0	0.8	0.6	0.7	0.4	0.5	0.7	2		
BeZSPN03F10			↑	1.1	1.5	1.4	3										
BeE30N01E09		putative purine nucleoside phosphorylase	↑	3.7	1.4	0.6	6	1.1	1.1	0.7	1.0	2.0	4.7	0.6	3		
BeE30N07A05		Nucleoside phosphorylase	↑	4.7	2.3	0.7	6	1.1	1.2	0.7	1.1	4.3	4.6	0.6	3		
BeE90D15C05	O94413	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	↑	1.9	1.7	1.3	3	1.1	0.9	0.9	0.9	1.4	1.7	0.9	6		
BeG90N19E11	Q871N5	Probable uracil phosphoribosyltransferase F	↑	2.2	1.1	0.8	5	1.0	0.9	0.7	0.8	1.0	1.2	0.7	5		
BeNSVP04F11		similar to cytidine deaminase	↑	2.3	0.7	0.4	5	0.9	1.2		1.3	2.6		1.0	6		
BeE120N25C08	P20054	Protein PYR1-3	↑					1.1	1.1	1.1	1.0	2.2	1.3	0.7	6		
BeE60C10B01	Q8D6V0	Predicted nucleotidyltransferase	↑						1.1	0.9	1.4	2.3	1.5	1.3	6		
BeE90D18C05	O42806	Cpa protein (Fragment)	↑					1.0	1.0	0.9	0.9	2.2	1.5	0.5	6		
Enovelamento e Modificação de Proteínas																	
BeE120N06H09	O13351	Ubiquitin-like protein smt3/pmt3	↓	0.5	0.7	1.2	1										
BeE120N20H04		putative protein serine/threonine kinase	↓	0.9	0.7	0.8	4										
BeE30N09G01	Q9M4C4	prefoldin subunit 4 VIP3 protein	↓	0.6	0.8	1.1	1										
BeE30N16B09	O77622	T-complex protein 1, zeta subunit	↓	0.7	0.9	0.9	1										
BeE30N22H03	Q9UTS	Hypothetical subtilase-type proteinase psp3	↓	0.6	0.9	1.2	1										
BeE60H10E07		T-complex protein 1, theta subunit	↓	0.5	0.8	0.8	1										
BeE60H22A09	Q13526	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	↓	0.4	1.0	0.9	1										
BeE60H30E02	O6953	20S proteasome subunit	↓	0.5	0.9	0.7	1										
BeE60H32E04	O42993	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	↓	0.6	0.7	0.8	1										
BeE60N11B08	Q9M77	Putative serine/threonine protein kinase	↓	0.6	0.7	0.9	1										
BeE90D20D04	P5999	T-complex protein 1, delta subunit	↓	0.7	0.9	0.9	1										
BeG90N21H11		aminopeptidase-like 1 [Xenopus laevis]	↓	0.6	0.8	1.0	1										
BeE60C24C07	Q7ZA53	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	↓	0.6	0.7	0.9	1	0.9	1.0	1.0	1.2	0.9	0.7	0.9	2		
BeE60N07C06	Q9UTM4	T-complex protein 1, epsilon subunit	↓	0.5				1.0	1.1	1.0	1.1	0.6	0.6	0.9	2		
BeE60N07G09	Q872U9	Probable chaperonin of the TCP1 ring comple	↓	0.7	0.8	0.8	1	1.0	0.9	0.9	1.0	0.6	0.7	0.7	2		
BeE60N16F09	Q95V46	Chaperonin subunit 1	↓	0.6	0.9	1.0	1	1.1	1.0	0.9	1.0	0.6	0.7	0.8	2		
BeG120N23B05	Q99832	T-complex protein 1, eta subunit similar to Chaperonin containing TCP1, subunit 4 (delta)	↓	0.6	0.8	0.9	1	1.0	1.0	0.9	0.9	0.7	0.7	0.8	2		
BeE60H30F05			↓					1.0	0.9	0.9	0.8	0.7	0.7	0.8	2		
BeE60N15H02	P24155	Thimet oligopeptidase	↓					1.1	0.9	1.0	0.8	0.7	0.6	0.9	2		
BeG120N17H03	P46595	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 4	↓					1.0	1.1	1.1	1.1	0.9	0.7	0.8	2		
BeG90N16A03	Q9VSF3	NEDD8 conjugating enzyme Ubc12	↓					0.9	1.0	1.0	1.1	0.9	0.6	0.9	2		
BeG90N22B10	Q7Q8R2	AgCP11849 (Fragment)	↓					1.0	0.9	0.9	0.8	0.8	0.6	1.1	2		

BeE60H29G11	Q9P6I2	Glutamate carboxypeptidase-like protein	↑	1.5	1.1	1.2	3	1.0	1.2	1.0	1.5	1.6	1.6	1.4	4
BeE60N15G05		DnaJ-like protein Msl1 - alfalfa	↑	1.6	1.2	1.0	5	1.1	1.1	1.3	1.4	2.4	2.7	0.8	7
BeE60H15E02		DnaJ-class chaperone regulator [C. neoformans	↑	1.4	1.0	0.8	5								
BeE60N18G04	O6178	protein N-terminal asparagine amidohydrolase	↑	1.7	1.4	1.2	3								
BeE90D03E05	Q9NTU3	Ubiquitin-activating enzyme 3	↑	1.6	1.5	1.0	3								
BeG60N12E03	O43447	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H	↑	1.5	1.1	0.9	5								
BeE90D05G05	Q7Z8F2	Putative serine/threonine phosphatase 2C ptc2	↑	2.3	1.9	0.9	5	1.0	1.3	1.5	2.2	4.9	4.8	0.9	7
BeG120N03B03		CasA	↑	2.2	1.2	0.8	5	1.0	1.2	1.1	1.4	2.3	3.7	0.9	7
BeE60H17C06	P52495	Ubiquitin-activating enzyme E1 1 (Fragment)	↑					1.0	1.1	1.1	1.4	1.1	1.1	0.7	6
BeE60H22F09	O74819	POLYUBIQUITIN	↑					0.9	1.2	1.2	1.4	1.3	1.5	1.2	6
Homeostase Redox															
BeE60C19G01	Q4IHX8	Thioredoxin peroxidase	↓	0.6	1.1	1.0	1								
BeE60H29E07	Q1137	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	↓	0.6	0.8	0.9	1								
BeE90N13F05	Q9NL96	Glutathione reductase	↓	0.2	1.3	0.9	2								
BeG120N18H03	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 2	↓	0.6	1.1	0.9	1								
BeG30N04A03	O1427	pyridoxine biosynthesis protein	↓	0.5											
BeE30N14F04	Q3M328	Putative glutathione S-transferase-like 6	↑	1.8	1.2	1.0	5								
BeE90D14B09		thioredoxin domain protein, DsbA family	↑	1.0	1.7	1.5	3								
BeE90D11E10	Q16961	Disulfide-like protein	↑	1.4	1.2	1.0	5	1.0	1.0	0.9	1.1	1.3	2.3	1.1	6
BeE30N18H03		Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase-related, FMN-binding protein	↑					1.1	1.2	0.9	1.1	1.2	1.4	1.0	6
BeE60N14F11	Q98GI3	Peroxiredoxin 2	↑					0.7	1.1	1.2	1.3	1.3	1.3	1.1	6
BeE90D18F01	P40581	Glutathione peroxidase 3	↑					0.9	1.1	1.3	1.4	1.2	1.5	1.2	6
Proteínas Ribossômicas / Tradução															
BeE120N37D12	P38665	60S ribosomal protein L24	↓	1.0	0.6	1.0	4								6
BeE60H23E04	O42952	40S ribosomal protein	↓	0.6	0.7	1.0	1								
BeE60N19C01	O74966	Probable small nuclear ribonucleoprotein G	↓	0.9	0.6	1.0	4								
BeE90D08E09	Q9XGL4	60S ribosomal protein L31	↓	0.7	1.0	0.9	1								
BeG120N01H09		structural constituent of ribosome [C. neoformans	↓	0.6	0.8	1.0	1								
BeG120N10H02	Q95V37	ribosomal protein L29 [Bombyx mori]	↓	0.6	0.9										
BeG90N04A04		Probable eukaryotic translation initiation factor	↓	0.6	0.7	1.1	1								
BeG90N09C08		Elongation factor G 1, mitochondrial precursor (mE	↓		0.3	1.3									
BeG90N15C05	Q9S826	Putative U3 small nucleolar ribonucleoprotein	↓	1.0	0.7	1.0	4								
BeE30N15A04	P7983	Eukaryotic translation initiation factor 3	↓	0.7	0.7	1.0	1	1.0	0.9	0.8	0.8	0.5	0.6	1.0	
BeG120N20E02	Q9NPE3	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3	↓	0.4	0.4	0.9	2	0.9	0.9	1.1	0.9	0.3	0.3	1.3	2
BeG60N15D01	O7469	SNU13 snRNP subunit homolog	↓	0.6	0.5	0.9	1	1.0	0.9	0.9	0.8	0.4	0.2	1.2	1
BeG90N02G11		phenylalanine-tRNA ligase	↓	0.9		0.5			0.9	1.0	0.9	0.4	0.9	1.0	1
BeG90N10A10	P32495	High mobility group	↓		0.5	0.9		1.0	1.0	0.9	0.9	0.5	0.4	1.2	2
BeG120N22D07	Q556	Arginyl tRNA synthetase, cytoplasmic	↓	0.7	0.6	1.2	1	1.0	1.1	1.3	1.0	0.5	0.5	1.7	1
BeNSVP10C04		eIF3/signalosome protein	↓	0.6				0.9	0.9	1.0	0.7	0.5	0.5	1.3	1
BeE30N13H12		lysyl-tRNA synthetase	↓					1.0	1.0	0.9	0.8	0.6	0.6	1.0	2
BeE30N18E04		glycyl-tRNA synthetase	↓					1.0	0.9	0.8	0.8	0.7	0.8	0.9	2
BeE30N22E01	O14339	60S ribosomal protein L17-A	↓					0.9	0.9	0.8	0.8	0.7	0.7	0.8	2
BeE60H15C05	P87144	Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	↓					1.0	1.0	1.2	1.0	0.6	0.7	1.1	2
BeG120N04E02		Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 1A	↓					0.9	0.9	0.9	0.8	0.7	0.6	1.0	2
BeG120N11F05		similar to Eukaryotic translation initiation factor	↓					0.9	1.1	0.9	0.9	0.6	0.6	1.1	2

BeG120N13E04	Q9HGT6	Seryl-tRNA synthetase, cytoplasmic IF5_YEAST Eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF-5)	↓					1.1	1.0	1.0	0.9	0.8	0.7	1.1	2
BeG30N06D06			↓					1.0	1.2	0.9	0.9	0.6	0.7	1.1	2
BeG30N13C06	O14044	Ribosomal RNA processing protein 28	↓					0.9	1.1		0.9		0.6	1.0	2
BeZSPN06C04	Q09692	tryptophanyl-tRNA synthetase	↓					1.1	1.0	1.2	1.1	0.6	0.9	1.6	2
BeZSPN17H02		similar to Fibrillarlin CG9888PA	↓					1.0	1.0	0.9	0.9	0.5	0.4	1.1	2
BeE60N04D02	Q9CHN6	Elongation factor P	↑	1.1	1.4	1.3	3								1
BeG30N13H07	Q13685	ribosome biogenesis protein Sgt1	↑	1.2		0.4									
BeG90N19F12	P29691	Elongation factor 2	↑	1.2	1.6	0.5	5								
BeG90N07C02	Q84KQ4	Elongation factor-1alpha (Fragment)	↑					1.0	1.1	1.0	1.1	1.5	1.6	0.9	
BeNSVP07H09	Q84KQ4	Elongation factor-1alpha (Fragment)	↑						1.1	1.3	1.1	1.4	1.4		6
Transdução de Sinal															
BeE120N02E04	Q7YXG1	soluble guanylyl cyclase 2 beta	↓	1.0	0.5	0.6	4								
BeE60N16D02	P3446	Guanine nucleotide-binding protein alpha-8	↓	0.4	0.8	0.8	2								
BeG90N08A02	Q9W711	activated protein kinase C receptor	↑	0.9	1.4	1.1	3								
BeZSPN16D09	Q12741	cAMP-dependent protein kinase catalytic sub	↑	1.2	1.4	1.3	3								
Resposta a Estresse															
BeZSPN11F03		10 kDa heat shock protein, mitochondrial	↓	0.5	0.6	0.9	1	1.0	0.9	0.8	0.8	0.4	0.4	0.8	1
BeG60N07C03	Q9S9N1	Hsp70-3 (<i>Blastocladiella emersonii</i>)	↓					1.1	1.0	0.8	0.8	0.6	0.7	1.0	2
BeE60H20C05	P22774	Hsp70-9 (<i>Blastocladiella emersonii</i>)	↑	5.9	2.2	0.5	6	1.0	0.9	0.6	1.2	4.0	4.4	0.5	3
BeE60H29E01		putative stress-related protein	↑	2.2	1.5	0.7	5	1.0	1.1	0.8	1.2	1.6	2.2	0.9	6
Estrutura Celular / Microtúbulos															
BeE120N07A12		roadblock-related dynein light chain	↓	0.6	0.7	1.1	1								
BeE60N12E01	Q9196	Myosin regulatory light chain cdc4	↓	0.7											
BeE90N17C06	Q9SMH3	Dynein 1-alpha heavy chain	↓	0.4	0.9	0.9	1								
BeE60H23E05		calponin/transgelin	↑	1.5	1.0	0.7	5								
BeG30N07C04	P25323	Myosin light chain kinase	↑	1.6		0.3									
BeE60N03E07		beta-tubulin	↑	1.4	1.5	1.0	3	1.1	1.2	1.0	1.2	1.4	1.8	0.9	6
BeE60N12G09	P7436	Tubulin beta-1 chain	↑	1.4	1.3	1.1	3	1.2	1.0	1.0	1.2	1.2	1.7	0.9	6
BeE60H28B01	P10989	Actin	↑					1.0	1.2	1.2	1.2	1.3	1.6	0.9	6
BeE60N13F03		beta-tubulin	↑					1.0	1.1	1.0	1.3	1.4	1.5	0.9	6
BeE90D08H04	Q9UFH2	Axonemal beta dynein heavy chain 17	↑						0.9	0.9	1.0	2.2	1.2	1.4	6
Transcrição / Processamento de RNA															
BeE90D17A08	Q7ZY47	ATP-dependent RNA helicase DDX42	↓	0.3	1.0	0.8	2								
BeZSPN12F04	Q3532	Probable ATP-dependent RNA helicase HAS1	↓	0.9	0.7	1.0	4								
BeG120N02A10	Q9916	Putative ATP dependent RNA helicase C1F7.02	↓	0.6	0.6	0.9	1	1.0	1.0	0.9	0.9	0.4		1.1	1
BeE30N22H05	O8198	RNA polymerase I, II and III 24.3 kDa subun	↓	0.2	0.7	1.0	2								
BeE90D16F01	Q9P6Q6	mRNA-capping enzyme subunit beta	↓		0.5										
BeG90N17F03	Q9NQT4	exosome component Rrp46 [Homo sapiens]	↓	1.2	0.5	0.5	4								
BeZSPN17G09	Q8BU5	DNA-directed RNA polymerases III 12.5 kDa	↓	0.8	0.6	0.9	4								
BeE30N15E05	P2441	Ras-related protein Rab-11A	↓	0.5	0.6	1.2	1	1.0	1.0	1.0	0.9	0.7	0.6	1.2	2
BeG90N10B01		DNA-directed RNA polymerase I subunit D protein	↓	0.6	0.6	1.0	1	0.9	1.0	0.9	0.9	0.5	0.5	1.3	2
BeE60N18A09	Q9UVL1	Nonhistone protein 6	↓					0.9	1.0	1.0	1.0	0.8	0.6	0.7	2
BeG60N07D01	Q8MYR3	La related protein	↓					1.0	1.0	0.8	0.7	0.6	0.6	1.2	2
BeE90D08E03		RNA polymerase II elongator-associated protein	↑	2.1	1.7	0.9	5	1.0	1.2	1.5	2.0	3.9	4.5	0.9	7
Transporte															
BeE120N01A01	Q87C4	Cationic amino acid transporter	↓	0.5	0.8	0.8	1								

BeE120N35H01	Q7SAQ1	Clathrin assembly protein 2 small chain	↓	0.6	0.6	0.7	1										
BeE60H21G09	Q8RBT1	Amino acid transporters	↓	1.0	0.7	0.8	4										
BeE90D19D08	Q8T665	ABC transporter AbcH.1	↓	0.6	1.0	0.9	1										
BeG120N07E03	Q9P8H	nuclear transport factor 2 (ntf-2), putative high affinity methionine permease [Aspergillus clavatus]	↓	0.6	0.8	1.1	1										
BeG90N14C01			↓		0.2												
BeE30N06H12		Peptide transporter PepT1	↓	0.7	0.7	1.0	1	1.0	0.9	0.9	0.8	0.6	0.7	0.9	2		
BeE30N10D02	Q6593	Oligopeptide transporter 2	↓	0.4	0.1	1.0	8	1.1	1.0	1.2	1.1	0.5	0.5	0.7	1		
BeE30N17A03	P4897	High affinity transporter for glutathione	↓	0.3	0.5	0.8	2	1.0	1.0	1.1	1.1	0.4	0.4	0.8	1		
BeE60N10A01	P38264	Inorganic phosphate transporter PHO88	↓	0.4	0.7	1.4	1	0.9	0.8	0.7	0.7	0.3	0.3	0.8	1		
BeE60N13C09	P7144	Outer mitochondrial membrane protein porin	↓	0.7	0.8	0.9	1	1.0	0.9	0.7	0.9	0.5	0.5	0.8	2		
BeG60N20F09	Q872I6	Probable iron inhibited ABC transporter 2	↓	0.7	0.7	1.0	1	1.0	1.0	1.1	1.0	0.7	0.7	1.4	2		
BeG90N09B05		proton-glutamate symporter	↓	0.5				1.1	0.9	0.8	0.5	0.4	0.4	0.7	2		
BeE120N04F11		putative mitochondrial carrier protein	↓					1.0	0.8	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	2		
BeE60H30F10	Q10481	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit tim13	↓					1.1	0.9	1.0	0.9	0.8	0.7	1.1	2		
BeE60N18A11		putative phosphate/phosphoenolpyruvate translocator	↓					1.0	1.0	0.9	1.0	0.8	0.6	0.8	2		
BeG120N24A07	Q8H727	ADP/ATP translocase	↓					1.2	1.0	0.7	0.6	0.7	0.8	2			
BeG30N12H02		probable amino acid transporter	↓					1.0	1.1	1.1	1.2	0.8	0.7	1.0	2		
BeG30N19C05	Q63424	Oligopeptide transporter, kidney isoform	↓					0.8	0.7	0.6	0.8	0.5	1.0	2			
BeG90N09D08	O74700	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM9	↓					0.9	0.8	0.8	0.6	0.6	0.4	1.0	1		
BeG90N16G06	Q9UUY0	calcium P-type ATPase	↓					1.0	1.0	1.0	0.9	0.7	0.6	0.9	2		
BeZSPN05F06		hypothetical protein [Neurospora crassa]	↓					1.0	1.0	1.0	0.9	0.7	0.8	1.5	2		
BeZSPN15C05		high-affinity iron permease [Rhizopus oryzae]	↓					0.9		0.8		0.6	0.5	2			
BeE90N13G10	P21851	dapter-related protein complex 2 beta 1 subunit	↑	1.3	1.5	1.0	3										
BeG120N07C03	Q84VI6	Phosphate transporter HvPT7	↑	1.2	1.3	1.3	3										
BeG60N01F09		methionine permease, putative [Neosartorya fischeri]	↑	1.6	2.1	0.9	3										
BeG90N07C10	Q8TGD1	tricarboxylate carrier, putative	↑	1.2	2.2	0.6	5										
BeE60H32G06	P15847	Trafficking protein particle complex subunit 5	↑	3.0	1.9	0.9	6	0.9	0.9	1.1	1.4	3.6	9.2	0.7	3		
BeE60N12D06	Q9JL62	Glycolipid transfer protein	↑	2.3	1.7	1.1	5	1.0	1.3	1.3	1.9	2.8	2.8	1.0	7		
BeG120N22G10		MFS quinate transporter	↑	1.4	1.0	0.6	5	1.0	1.0	1.1	1.2	1.7	1.0	0.9	6		
BeG90N01D10	Q8WZW8	Probable YHM1 mitochondrial carrier protein	↑	1.6	1.0	0.9	5	1.0	0.9	0.8	0.8	0.9	0.8	0.7	5		
BeG90N16C06	P42833	Hexose transporter HXT14	↑	2.0	1.0	0.4	5	1.1	0.9	1.2	1.5	1.9	1.1	1.0	6		
BeNSVP07B10		proton glutamate symport protein	↑	0.9	1.6	1.0	3	0.8	0.8	1.0	1.2	1.4	1.8	1.0	6		
BeZSPN02C07		hypothetical nicotinamide mononucleotide transporter	↑					0.9	1.1	1.1	1.0	1.2	1.6	1.1	6		
Transposição																	
BeE60H29B05		Putative transposase	↓					1.0	0.7	0.9	0.9	0.6	0.5	1.1	2		
BeZSPN17B12		Putative transposase	↓					0.9	0.8	0.8	0.9	0.7	0.6	1.2	2		
Outros																	
BeE30N07B02		Calmodulin (CaM)	↓	0.6	0.8												
BeE60C05B10	Q882A7	Oxidoreductase, Gfo/Idh/MocA family	↓	0.5	0.7	0.9	1										
BeE60C06H06	Q7WWT9	Putative NagM-like protein	↓	0.7	0.7	0.8	4										
BeE60C15B06	Q9I264	Fe2+-dicitrate sensor	↓	0.3	0.9	0.8	2										
BeE60N16C10		fiber protein Fb27 [Gossypium barbadense]	↓	0.1	0.9	0.9	2										
BeE60N18G11		bud site selection-related protein, putative [Cryp	↓	0.1		1.0											
BeE90N19D05	Q8NFV4	similar to abhydrolase domain containing 11	↓		0.2												

BeE90N20H07	Q7VUP2	Putative hydrolase	↓	0.4													
BeG60N01F08		zinc finger protein, putative [Cryptococcus neoformans]	↓	0.7	0.8	0.9	1										
BeG90N03C01	O74362	Conserved hypothetical protein	↓	1.0	0.2	0.4	8										
BeE120N27B06		pyrimidine 5'-nucleotidase, putative	↓	0.6	0.8	1.0	1	1.0	1.1	1.0	1.1	0.7	1.0	1.7		4	
BeE60H31F05		similar to DC6	↓	0.5	0.8	1.0	1	0.9	0.8	0.9	0.7	0.6	0.6	1.0		2	
BeE60N16C07		similar to armadillo repeat containing 4	↓	0.5	0.8	1.3	1	1.0	0.7	0.7	0.8	0.4	0.3	0.8		1	
BeE90N06H03	Q81CV	Hydrolase	↓	0.0	0.1				0.4	0.7	0.2		0.3	1.2		8	
BeG120N02B04	P32469	Diphthine synthase	↓	0.5	0.5	0.9	1	1.0	1.0	0.8	0.9	0.5	0.4	1.1		1	
BeG30N06H12	Q8NEY6	Gastric cancer antigen Zg14 (Fragment)	↓	0.6	0.7	1.0	1	1.0	1.0	1.0	0.9	0.6	0.6	1.3		2	
BeG30N20D08	Q9UUG1	Brix domain containing protein 1 homolog	↓	0.5	0.7	1.0	1	0.9	1.2	0.9	0.9		0.4	1.2		1	
BeG60N08E04	O42468	PP2A inhibitor	↓	0.5	0.6	1.0	1	1.0	1.1	0.7	0.8	0.3	0.3	1.2		1	
BeE30N06D09		N-alpha-acetyltransferase major subunit	↓					1.0	0.9	0.8	0.8	0.7	0.6	0.9		2	
BeE30N13C08	Q91V01	Putative transmembrane protein	↓					1.0	1.1	1.0	1.0	0.8	0.6	0.9		2	
BeE60N13A07	P53011	Nuclear pore protein SEH1	↓					1.2	0.8	0.9	0.8	0.5	0.5	0.7		2	
BeE60N16E08		similar to required for meiotic nuclear division 5 homolog A	↓					1.1	1.0	0.9	0.9	0.7	0.6	0.8		2	
BeE60N17D11	O14220	Meiotic expression up-regulated protein 26	↓					0.9	1.0	0.9	1.0	0.8	0.6	0.8		2	
BeE60N19G04		similar to PRIP-interacting protein PIPMT	↓						0.9	0.8	0.9	0.6	0.5	1.0		2	
BeG30N05D12		protein arginine n-methyltransferase 1	↓					0.9	1.1	1.1	1.1	0.6	0.5	1.3		1	
BeG60N19A03	Q9W3Y0	RE14402p Zinc finger protein	↓					0.9	1.0	1.1	1.0	0.5	0.6	1.2		2	
BeZSPN15C05	Q09919	Hypothetical protein C1F7.07c in chromosome	↓						0.9		0.8		0.6	0.5		2	
BeE120N37B07	Q9C5	Dpy-30-like protein	↑	1.1	1.6	1.2	3										
BeE30N02D01		Vacuolar protein sorting-associated protein 26	↑	1.8	1.6	1.0	5										
BeE30N20C05	P97834	COP9 signalosome complex subunit 1	↑	1.4	1.0	1.1	5										
BeE60H32A03	Q7YZR8	ferritin GF2	↑	1.7	1.3	0.7	5										
BeE60N03D02	Q83L76	putative phosphohydrolase	↑	1.4	1.3	1.1	3										
BeE60N10G01	O94453	Ubiquinone biosynthesis protein COQ4	↑	1.8	1.5	1.0	5										
BeG30N14G08	Q7XJ13	Chloroplast nucleoid DNA-binding protein-li	↑	1.2		0.2											
BeZSPN14F11	Q8AVD5	Similar to Benzodiazepin receptor	↑	1.6													
BeZSPN16C07	Q9251	similar to Ring finger protein 121	↑	1.6													
BeE30N07B04	P53326	Hypothetical 81.2 kDa protein in MES1-FOL2	↑	1.7	1.4	0.9	5	1.0	1.0	1.2	1.7	2.4	2.8	1.4		7	
BeE60N13B06	Q8AVD5	Similar to Benzodiazepin receptor	↑	2.2	1.8			1.0	0.9	0.8	1.1	1.5	2.1	0.7		6	
BeG120N23D09		putative protein disulfate isomerase	↑	1.5	1.8	1.1	3	1.0	1.2	1.2	1.5	1.9	1.6	0.8		6	
BeZSPN05D01		similar to Protein Mo25 (dMo25)	↑	1.8		1.2		0.9	1.2	1.0	1.3	1.5	1.9	1.0		6	
BeZSPN10F11		Multitransmembrane protein (ISS)	↑	1.7		1.3		1.1	1.1	1.1	1.5	1.7	1.6	1.1		6	
BeG90N06G12		acyl-coA-binding protein, ACBP	↑					1.0	1.1	1.2	1.5	1.6	1.5	1.0		6	

Para melhor compreender a resposta transcricional de *B. emersonii* à carência de oxigênio, analisaremos a seguir, com mais detalhes, as categorias funcionais mais marcantes e suas correlações com o estresse de hipóxia.

5.1.7.1 No Match

Como pode ser observado na **Figura 15**, uma grande fração (~40%) dos genes afetados pela concentração de oxigênio dissolvido não possuem similaridade com nenhuma sequência depositada no GenBank e estão anotados como *No Match*. Isto se deve provavelmente ao alto número de *No Matches* depositados nas lâminas de microarranjo (cerca de 56%). Se por um lado isto representa certa limitação, por outro lado não deixa de ser intrigante que existam tantos genes sem função conhecida participando da resposta deste fungo à carência de oxigênio.

5.1.7.2 Metabolismo de Aminoácidos

A maioria dos genes afetados por hipóxia que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos, apresentou um perfil de repressão. Dentre os reprimidos estão genes que participam da biossíntese de diversos aminoácidos, como: *ornithine-oxo-acid transaminase* (prolina e arginina), *2-isopropylmalate synthase* (leucina), *cysteine synthase* (cisteína), *acetolactate synthase Ilv2* (valina, leucina e isoleucina), *aspartokinase* (metionina, lisina e treonina), *histidinol phosphate aminotransferase* (histidina) e *5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase* (metionina). Além disso, também está reprimido o gene que codifica a enzima *arginase*, que participa da última etapa do ciclo da uréia.

Outro importante gene reprimido é o que codifica uma glutamato desidrogenase (*glutamate dehydrogenase 3*). Esta enzima transforma glutamato em α -cetoglutarato, alimentando o ciclo do ácido cítrico. Sua repressão é condizente com o estado de hipóxia, no qual a falta de oxigênio inviabiliza o funcionamento normal do ciclo do ácido cítrico.

Dois genes que foram fortemente reprimidos e merecem destaque são os que codificam a enzima *5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase*

e a enzima *S-adenosylmethionine synthetase*. Essas duas enzimas são responsáveis pela biossíntese de S-adenosil metionina (SAM ou AdoMet) (**Figura 16**), molécula com um importante papel em processos biossintéticos, através da metilação de ácidos nucleicos, fosfolípidos, aminas e proteínas. A forte repressão desses genes e a provável diminuição na síntese de SAM devem estar relacionadas à economia de energia necessária à célula sob carência de oxigênio, uma vez que os processos biossintéticos dependentes de SAM são bastante dispendiosos em ATP.

Figura 16: Genes responsáveis pela biossíntese de S-adenosil-metionina (SAM). Os números à esquerda das enzimas indicam o número de vezes que seus genes foram reprimidos no ponto C0 de hipóxia gradual.

Somente três genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos tiveram perfis induzidos por hipóxia. Um deles codifica a enzima *argininosuccinate synthase*, responsável pela síntese de argininosuccinato a partir de citrulina e aspartato, uma reação limitante do ciclo da uréia. No entanto, com a descoberta do ciclo da citrulina-NO, esta enzima tem sido mostrada como um potencial passo limitante na síntese de óxido nítrico (NO) (Husson *et al.*,

2003). Foi demonstrado que NO é produzido em altos níveis, em hipóxia, por mitocôndrias de mamíferos (Schild *et al.*, 2003; Valdez *et al.*, 2004) e também de leveduras (Castello *et al.*, 2006). Em leveduras também foi demonstrado que o NO produzido pelas mitocôndrias em hipóxia estimula a expressão do gene *CYC7*, um gene de hipóxia em leveduras, e também leva a um aumento da nitração de resíduos protéicos de tirosina, sugerindo em possível papel do NO na sinalização de hipóxia (Castello *et al.*, 2006).

Outro gene com perfil induzido codifica a *Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase*, enzima limitante para a biossíntese de prolina, a partir de glutamato. Também foi induzido o gene da enzima *Glutamine synthetase*, que sintetiza glutamina, condensando amônia a glutamato.

5.1.7.3 Ciclo Celular

Quatro genes codificando proteínas envolvidas com o ciclo celular foram induzidos por hipóxia. São duas septinas, uma proteína quinase dependente de ciclina (PHOB) e uma *S-phase kinase-associated protein 1A*. O gene codificando uma *Cyclin-dependent kinase regulatory subunit* foi reprimido. Esta regulação da expressão de genes envolvidos em ciclo celular está provavelmente relacionada às modificações morfológicas e no crescimento de *B. emersonii*, observadas quando o fungo está exposto ao estresse de hipóxia.

5.1.7.4 Parede Celular

Observa-se nesta categoria a indução de dois genes codificando quitinases (*Chitinase* e *Chitinase Chi80 precursor*) e um codificando uma quitina desacetilase (*Chitin deacetylase*). Enquanto as quitinases quebram as ligações glicosídicas, a quitina desacetilase hidrolisa os grupos N-acetamida dos resíduos de N-acetil-D-glicosamine deste polissacarídeo, resultando na provável digestão e reorganização da parede de quitina em *B.*

emersonii. Adicionalmente, encontramos como reprimido um gene codificando uma quitina sintetase (*Chitin synthase 1*), reforçando ainda mais o efeito da digestão de quitina em hipóxia. Esta regulação da expressão de genes envolvidos com o metabolismo de quitina está provavelmente relacionada às modificações morfológicas de alongamento celular, observadas nas células de *B. emersonii* sob carência de oxigênio (seção 5.1.1).

5.1.7.5 Estrutura de Cromatina

Nesta categoria encontramos a repressão de três genes que codificam histonas (H2A, H2B e H3) e de dois genes relacionados à morte celular programada. Estes dois últimos representam mais um indício de que *B. emersonii* possui um mecanismo adaptativo de sobrevivência à falta de oxigênio.

5.1.7.6 Metabolismo Energético

Nas seções iniciais desta tese, o oxigênio foi destacado por seu papel fundamental no metabolismo energético de grande parte dos organismos, inclusive em anaeróbios facultativos como *S. cerevisiae*. Por este motivo, é de extrema importância que estes organismos tenham como modular e reprogramar as funções essenciais de seu metabolismo, de acordo com a disponibilidade de oxigênio. Em *B. emersonii* isso não parece ser diferente. Como veremos a seguir, este fungo modula a transcrição de vários genes relacionados ao metabolismo energético, redirecionando seu metabolismo aeróbico para o anaeróbico fermentativo.

Para facilitar a visualização dos genes de *B. emersonii* relacionados ao metabolismo energético afetados por hipóxia gradual e/ou direta foram construídas a **Figura 17** que representa a via glicolítica e ciclo do ácido cítrico, e a **Figura 18** que representa a cadeia respiratória. Como pode ser observado na **Figura 17**, grande parte dos genes que codificam

enzimas da via glicolítica foram induzidos em hipóxia, ao passo que no ciclo do ácido cítrico, a maioria dos genes encontra-se reprimido ou não sofre alteração na expressão. Cabe salientar que as induções mais marcantes ocorreram justamente nas duas subunidades da fosfofrutokinase (PFK1 e PFK2), enzima que corresponde ao principal sítio de regulação da glicólise. Adicionalmente, também observamos uma forte indução do gene da lactato desidrogenase, enzima responsável pela reoxidação de NADH através da formação de lactato a partir de piruvato. Isso nos leva a crer que, pelo menos transcricionalmente, *B. emersonii* parece tentar direcionar seu metabolismo aeróbico para o anaeróbico fermentativo, sugerindo um exemplo do chamado “Efeito Pasteur”. Na **Tabela 3** observa-se também a forte indução de um gene que codifica a enzima álcool desidrogenase dependente de NADP⁺ (NADP-dependent alcohol dehydrogenase), mas esta enzima tem a mesma função que a álcool desidrogenase fermentativa dependente de NAD⁺. Na verdade ela participa do metabolismo de alcoóis alifáticos.

Como mostrado na seção 5.1.6, alguns genes de enzimas da via glicolítica tiveram suas expressão analisada por qRT-PCR, pois não estavam presentes nas lâminas de microarranjos. Um desses genes corresponde a uma fosfofrutoquinase dependente de pirofosfato (pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase) e foi bastante induzido por hipóxia. Este gene, descoberto em 1974 (Reeves *et al.*, 1974) na ameba parasita *Entamoeba histolytica*, atua convertendo frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bisfosfato, utilizando pirofosfato inorgânico, ao invés de ATP, como fazem normalmente as fosfofrutoquinases dependentes de ATP. Com isso, a via glicolítica acaba economizando um ATP por mol de glicose, ficando com um saldo de 3 ATP, ao invés de 2. Esta enzima já foi descrita em diversos organismos como bactérias, protistas e até plantas superiores (Mertens, 1991), no entanto, até o momento não foi descrita em nenhum outro fungo (fonte: KEGG-Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Curiosamente, verificou-se que a atividade da

PPi-PFK em sementes de arroz (*Oryza sativa*) submetidas à hipóxia aumenta consideravelmente, sugerindo a utilização a PPi-PFK ao invés da PFK normal em plantas superiores em condições de hipóxia, o que poderia aumentar em até 50% o rendimento de ATP da glicólise, graças ao uso do pirofosfato inorgânico como doador de fosfato (Mertens *et al.*, 1990).

Hipóxia

Figura 17: Expressão dos genes codificando enzimas do metabolismo energético central de *B. emersonii* em hipóxia gradual e/ou direta. Os genes induzidos, reprimidos e não afetados estão em vermelho, verde e branco, respectivamente. Genes ainda não sequenciados em *B. emersonii* estão em cinza. Genes marcados com * indicam que foram analisados por qRT-PCR, pois não estavam presentes nas lâminas do microarranjo. Os níveis de indução ou repressão de cada gene podem ser acessados na **Tabela 3**, ou na seção 5.1.6, no caso dos genes marcados com *.

Na **Figura 18**, a seguir, pode-se observar que a fosforilação oxidativa também é transcricionalmente afetada, ao menos em parte, por hipóxia. Ao que parece, existe certa tendência à repressão desses genes. Foram reprimidos os genes de duas subunidades do complexo V (ATP sintase), o gene do citocromo C (cerca de três vezes) e o gene codificando uma das subunidades do complexo I (NADH ubiquinona oxidoreductase). Dois genes foram induzidos, codificando a subunidade 5 do complexo IV (COX-5) e uma subunidade de 12kDa do complexo succinato desidrogenase.

Hipóxia

Fosforilação Oxidativa

Figura 18: Expressão gênica de enzimas da cadeia respiratória de *B. emersonii* em hipóxia gradual e/ou direta. Os genes induzidos, reprimidos e não afetados estão em vermelho, verde e branco, respectivamente.

Outro gene fortemente induzido em hipóxia é o que codifica uma anidrase carbônica (carbonic anhydrase protein) (**Tabela 3**). Esta enzima é responsável pela rápida conversão de dióxido de carbono (CO₂) em bicarbonato e prótons, como mostra a reação a seguir:

Além de outras funções fisiológicas, as anidrases carbônicas geralmente estão relacionadas à homeostase de CO₂ e pH, controlando as acidoses metabólicas e respiratórias. Entretanto, não há relatos sobre a indução de anidrases carbônicas por hipóxia em outros fungos. Uma provável função desta anidrase carbônica induzida em *B. emersonii* seria combater uma possível acidose causada pela fermentação láctica.

Em mamíferos, a anidrase carbônica IX (CAIX) é um dos principais alvos do fator HIF-1 α e, por isso, é bastante induzida em hipóxia. CAIX vem sendo correlacionada com a progressão e invasibilidade tumoral e, por ser uma anidrase carbônica de membrana, tem se demonstrado que ela participa do controle de acidose intracelular e da acidificação do ambiente tumoral extracelular (Winum *et al.*, 2008).

Outro grupo de genes que merece destaque, corresponde a quatro subunidades da (H⁺)ATPase vacuolar, que foram induzidos em hipóxia (**Tabela 3**). Este tipo de (H⁺)ATPases, também chamada de V-ATPase, atua como uma bomba de prótons dependente de ATP, que têm a função tanto de acidificar compartimentos intracelulares, quanto transportar prótons através da membrana plasmática (Jefferies *et al.*, 2008). Esta regulação, em *B. emersonii*, também pode estar relacionada com uma provável acidificação intracelular causada pela fermentação láctica.

5.1.7.7 Metabolismo de Lipídeos

Esta categoria merece especial atenção, pois a própria síntese de ergosterol e ácidos graxos é dependente de oxigênio. Como pode ser observado na **Tabela 3**, a carência de oxigênio levou à indução significativa de vários genes relacionados ao metabolismo de lipídeos, assim como foi observado em *Saccharomyces cerevisiae* (Becerra *et al.*, 2002; Kwast *et al.*, 1999; ter Linde *et al.*, 1999), *Schizosaccharomyces pombe* (Todd *et al.*, 2006) e *Candida albicans* (Setiadi *et al.*, 2006) e *Cryptococcus neoformans* (Chun *et al.*, 2007).

Um dos genes fortemente induzidos é o que codifica a Δ -9 ácido graxo desaturase, que corresponde ao gene *OLE1* de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta enzima tem a função de formar os ácidos graxos monoinsaturados palmitoleico (16:1) e oleico (18:1), a partir de palmitoil (16:0) ou estearoil (18:0) coenzima A (Ntambi, 1999), adicionando uma dupla ligação entre os carbonos C9 e C10, utilizando oxigênio molecular (**Figura 19**). Tais ácidos graxos insaturados são essenciais para manter a fluidez e expansão da membrana citoplasmática. Em *S. cerevisiae*, proporção de ácidos graxos insaturados incorporados à membrana, está relacionada à tolerância a etanol, choque térmico e movimento e herança mitocondrial (Alexandre *et al.*, 1994; Carratu *et al.*, 1996; Stewart and Yaffe, 1991), mostrando que a regulação da expressão deste gene tem importância fisiológica em situações de estresse. Adicionalmente, outro gene interessante, complementar ao da Δ -9 ácido graxo desaturase e também bastante induzido por hipóxia, é o que codifica a enzima cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase (CFA sintase). Esta enzima atua adicionando um anel ciclopropano em duplas ligações de fosfolipídeos, utilizando S-adenosil metionina (SAM) como doador de grupo metila (**Figura 19**), favorecendo também a fluidez da membrana e protegendo os fosfolipídeos de ataques por algumas espécies reativas de oxigênio (Cronan, 2002).

Figura 19: Esquema das modificações de lipídeos promovidas pelas enzimas Δ -9 Ácido graxo desaturase e CFA sintase (Adaptado de Cronan, 2002).

O curioso é que embora o gene da enzima CFA sintase esteja muito induzido em hipóxia, dois principais genes responsáveis pela biossíntese de S-adenosil metionina (SAM) estão fortemente reprimidos nesta condição (ver Metabolismo de aminoácidos na seção 5.1.7.2). Como foi dito anteriormente, além de S-adenosil metionina requerer ATP em sua síntese, ela participa de diversos processos biossintéticos nas células e, por esta razão, é totalmente conveniente que sua síntese seja diminuída em hipóxia. Por outro lado, como o processo de adição de anéis ciclopropano em fosfolipídeos parece ser importante para a adaptação de *B. emersonii* ao estresse de hipóxia e, por isso, a expressão do gene da CFA sintase é fortemente aumentada, talvez na tentativa de suprir a falta de SAM disponível.

Também foram induzidos os genes codificando as enzimas *C-4 methyl sterol oxidase*, *C-5 sterol desaturase* e *fatty acid-2 hydroxylase*, que em *Cryptococcus neoformans* (Chang *et al.*, 2007) e *Schizosaccharomyces pombe* (Todd *et al.*, 2006), são alvos do ortólogo do fator SREBP de mamíferos (seção 2.2). Estes ortólogos têm mostrado um papel

central na adaptação destes fungos ao crescimento em hipóxia (Hughes *et al.*, 2005; Todd *et al.*, 2006).

Além destes genes, vários outros relacionados com processos biossintéticos de lipídeos também foram induzidos por hipóxia, como fatty acid synthase, delta 4-(E)-sphingolipid desaturase, 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase e phosphatidylserine decarboxylase. Interessantemente, os únicos genes reprimidos foram duas Enoyl coenzyme A hydratases, que são enzimas responsáveis por metabolizar ácidos graxos produzindo Acetil-CoA e energia. Visto que as moléculas de Acetil-CoA não poderão ser eficientemente oxidadas pelo ciclo de Krebs, devido à falta de oxigênio, faz todo sentido estes genes estarem reprimidos.

5.1.7.8 Homeostase Redox

Muito tem sido descoberto a respeito da resposta transcricional a hipóxia e os mecanismos sensores de oxigênio tanto em mamíferos quanto em leveduras (seção 2.2). Entretanto, a natureza dos sinais através dos quais as células detectam o oxigênio presente, ainda não foi totalmente elucidada. Tem sido proposto que no sistema HIF-1 de mamíferos, as espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas na mitocôndria em condições de hipóxia podem aumentar a proporção $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$ via reação de Fenton, diminuindo, assim, a ação das prolil-hidroxilases, o que leva à estabilização de HIF-1 α (Taylor, 2008). O mesmo tem sido proposto para *Saccharomyces cerevisiae*, apesar de essas leveduras não possuírem o fator HIF. Foi demonstrado que o complexo III mitocondrial de leveduras é necessário para o aumento da produção de ROS mitocondrial e para a expressão de um grupo de genes induzíveis por hipóxia, indicando que a formação de ROS poderia ter um papel na indução da expressão destes genes (Guzy *et al.*, 2007). A formação de ROS mitocondrial em hipóxia ainda tem sido tema de discussão em diversos trabalhos e ainda não foi completamente

elucidada devido às dificuldades metodológicas de medir essas espécies. Ao que parece, a formação de ROS em hipóxia é limitada à mitocôndria e, por isso, não conferem um estresse oxidativo propriamente dito.

Em *B. emersonii*, podemos observar que certos genes relacionados a resposta a estresse oxidativo foram induzidos por hipóxia (**Tabela 3**). Estes genes codificam enzimas como Glutathione-S-transferase (GST), Glutathione peroxidase, Peroxiredoxina e proteínas com domínios Piridoxamina e Tiorredoxina. Essa resposta nos levaria a crer que de fato existe um estresse oxidativo ocorrendo em *B. emersonii* submetida à hipóxia. No entanto, foram também reprimidos alguns genes relacionados a este tipo de estresse, como Glutathione redutase, Superoxido dismutase (Cu-Zn), Tiorredoxina peroxidase, Glutathione-S-transferase microsomal e uma proteína relacionada à biossíntese de Piridoxina. Provavelmente estes genes foram reprimidos em hipóxia, pois a falta de oxigênio molecular intuitivamente levaria à diminuição da formação de suas espécies reativas, mas o fato de encontrarmos alguns genes induzidos nos leva a pensar que neste fungo também possa estar havendo a produção de ROS em hipóxia.

5.1.7.9 Proteínas Ribossômicas / Tradução

Como se sabe, a síntese protéica, juntamente com o transporte iônico por membranas, está entre os processos mais dispendiosos em energia para as células. Em condições de hipóxia, fica claro, como foi dito na seção 2.1, que o aproveitamento dos nutrientes para produção de energia é menor do que na presença de oxigênio. Desta maneira, uma das adaptações dos organismos, principalmente daqueles tolerantes à carência de oxigênio, é a economia de energia. Em *B. emersonii*, isso não parece ser diferente, pois a categoria *Proteínas Ribossômicas / Tradução* se destacou como uma das funções celulares com maior número de genes reprimidos por hipóxia (**Figura 15**).

Podemos observar (**Tabela 3**) que foram reprimidos diversos genes relacionados a subunidades ribossômicas, fatores de iniciação de tradução e síntese de tRNAs. Dentre os poucos induzidos estão quatro fatores de elongação da tradução. Tal comportamento de inibição de síntese protéica em hipóxia também pode ser observado em células humanas (Connolly *et al.*, 2006) e em fungos como *Cryptococcus neoformans* (Chun *et al.*, 2007).

5.1.7.10 Resposta a Estresse

Nesta categoria encontramos a forte indução do gene codificando a proteína de choque térmico mitocondrial Hsp70-9 (Georg Rde and Gomes, 2007). Foi mostrado recentemente que hipóxia constante induz da expressão dos genes que codificam as proteínas de choque térmico Hsp70 e Hsp23 em *Drosophila melanogaster*, e que essa indução é responsável por um aumento significativo na sobrevivência das moscas (Azad *et al.*, 2009). Em células de mamíferos, foi demonstrado que a indução de Hsp70 em hipóxia é dependente do fator HIF-1 e que esta chaperona possui um importante papel protetor contra o estresse de hipóxia tanto em células tumorais (Huang *et al.*, 2009; Tikhonova *et al.*, 2008), quanto em células renais, neurônios e até em células-tronco mesenquimais (Bidmon *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2002; Papadopoulos *et al.*, 1996; Plumier *et al.*, 1997; Rajdev *et al.*, 2000; Vicencio *et al.*, 2003). A indução de Hsp70 por hipóxia também foi relatada em fungos como *Candida albicans* (Setiadi *et al.*, 2006) e *Cryptococcus neoformans* (Chun *et al.*, 2007).

Por outro lado, a hipóxia levou à repressão de dois genes de proteínas de choque térmico: uma Hsp mitocondrial de 10kD e a Hsp70-3. Esta última corresponde à Hsp70 constitutiva de *B. emersonii* e não se mostrou induzida nem mesmo em choque térmico (Georg Rde and Gomes, 2007).

5.1.7.11 Estrutura Celular / Microtúbulos

Como pode ser observado na **Tabela 3**, esta categoria apresentou três genes reprimidos e nove induzidos por hipóxia. Estes transcritos codificam proteínas que compõem cadeias de actina, miosina, tubulina, dineína, calponina e trangelina. Como se sabe, tais proteínas estão entre os componentes mais importantes do citoesqueleto. Elas estão envolvidas em vários processos biológicos como mudanças de forma, crescimento, mobilidade, secreção, divisão e diferenciação (Cleveland and Sullivan, 1985; Farmer *et al.*, 1986). Provavelmente, este tipo de regulação deve estar associado às modificações morfológicas observadas nas células de *B. emersonii* submetidas à hipóxia.

O gene codificando a proteína calponina/trangelina, que foi encontrado induzido em hipóxia, apresenta na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, uma função de estabilização de filamentos de actina contra desmontagem da cadeia (Goodman *et al.*, 2003). Em humanos, o gene da trangelina apresentou-se induzido em tecido muscular liso arterial pulmonar submetido à hipóxia, mas de maneira independente do fator HIF-1 (Zhang *et al.*, 2009).

5.1.7.12 Transcrição / Processamento de RNA

Acompanhando a repressão dos genes relacionados à síntese protéica (seção 5.1.7.9), a categoria de *Transcrição / Processamento de RNA* também foi marcada por uma regulação negativa sob hipóxia, com destaque para RNA helicases e diversas subunidades de RNA polimerases.

5.1.7.13 Transporte

O transporte por membrana, como foi dito anteriormente, é um processo bastante dispendioso em energia para as células. Por isso, é perfeitamente plausível uma regulação negativa de genes relacionados a esta categoria, quando em condições de hipóxia. A **Tabela**

3 mostra que diversos genes que codificam transportadores foram reprimidos. Um desses genes codifica uma ADP/ATP translocase, que transporta ATP para fora da matriz mitocondrial e ADP para dentro. Sua repressão faz sentido, pois na falta de oxigênio a quantidade de ATP produzida pela cadeia respiratória é drasticamente diminuída. Também foram reprimidos genes de transportadores de aminoácidos, além de dois transportadores do tipo ABC, conhecidos pela translocação de diversos substratos contra gradientes de concentração, através da hidrólise de ATP (Higgins, 1992). Observamos também forte repressão de um gene codificando um transportador de glutatona de alta afinidade.

Não encontramos, entretanto, somente genes reprimidos. Observamos também a indução de diversos transportadores que devem ser importantes para a adaptação à carência de oxigênio. Um deles é o transportador de glicose HXT14. Sua indução é totalmente favorável para uma célula que, como dissemos anteriormente, está privilegiando o metabolismo anaeróbico de glicose. Além deste, também destacamos como induzidos, genes de transportadores de nicotinamida mononucleotídeo, metionina, e ácidos tricarboxílicos.

5.1.8 Comparação da resposta transcricional de *B. emersonii* com a de outros fungos

Comparando nossos dados com a resposta transcricional de outros fungos ao estresse de hipóxia, disponível na literatura, pudemos observar que *B. emersonii* representa um modelo de estudo bastante peculiar para este tipo de estresse.

A partir de dados disponíveis para *Trichoderma reesei* (Bonaccorsi *et al.*, 2006) ou *Cryptococcus neoformans* (Chun *et al.*, 2007) observamos certas semelhanças marcantes como a repressão de um número significativo de genes relacionados à síntese protéica (incluindo proteínas ribossômicas) e a indução de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos e síntese de esteróis, além de genes de resposta a estresse. No entanto, a principal diferença encontrada em *B. emersonii*, em relação a esses fungos, consiste no metabolismo

energético. Como relatado nesta tese, em hipóxia, *B. emersonii* favorece o metabolismo anaeróbico. Isso se verificou pela indução de genes que codificam enzimas da via glicolítica e lactato desidrogenase, ao passo que em relação ao ciclo do ácido cítrico, a maioria dos genes encontram-se reprimido ou não sofrem alteração na expressão, o que sugere um “Efeito Pasteur” (ver **Figura 17**).

Em *Cryptococcus neoformans*, o metabolismo energético parece não sofrer regulação transcricional significativa em hipóxia (Chun *et al.*, 2007). Por sua vez, em *Trichoderma reesei* ocorre diminuição na produção de ATP, como resultado de uma drástica repressão da transcrição da maioria dos genes codificando enzimas da via glicolítica e do ciclo do ácido cítrico (Chun *et al.*, 2007). Desta forma, a resposta *B. emersonii* parece assemelhar-se mais à resposta de *Saccharomyces cerevisiae*, pois nessa levedura já foi demonstrado que a carência de oxigênio leva a um re-direcionamento metabólico de aerobiose para anaerobiose (fermentação) devido a uma forte indução de genes responsáveis pelo metabolismo anaeróbico (Kwast *et al.*, 2002). Este re-direcionamento metabólico também pode ser observado em células de mamíferos submetidas à hipóxia (Helmlinger *et al.*, 1997; Vogt *et al.*, 2001), sendo então por esta razão a levedura *Saccharomyces cerevisiae* estudada como modelo de resposta à privação de oxigênio. No entanto, nossos resultados mostram que *B. emersonii* seria um modelo mais conveniente, pois o fato de *S. cerevisiae* ser um organismo anaeróbico facultativo limita sua comparação com mamíferos.

5.1.9 Validação dos Microarranjos de cDNA

5.1.9.1 Hipóxia Gradual

Para validarmos os dados de microarranjo de cDNA de hipóxia gradual realizamos experimentos de RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) para 6 genes, sendo 3 com perfis de indução e 3 com perfis de repressão, utilizando duas réplicas biológicas independentes. As

sequencias dos oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de qRT-PCR estão mostradas na **Tabela 1** (seção 4.13). Como normalizador, foi utilizado o gene BeE60H30A07, que codifica uma heat shock protein 90 kDa. Este normalizador foi escolhido, pois sua expressão não variou nos microarranjos de hipóxia gradual. Como pode ser observado na **Figura 20**, a seguir, a comparação direta entre as duas metodologias mostra que elas foram qualitativamente coincidentes, o que valida os resultados obtidos no microarranjo.

Figura 20: Validação dos microarranjos de cDNA de Hipóxia Gradual por RT-PCR quantitativo. Nas ordenadas estão mostradas as razões de expressão e nas abscissas as condições de oxigênio dissolvido. As barras verticais representam os desvios-padrão das análises realizadas em duplicata biológica.

5.1.9.2 Hipóxia Direta

Realizamos também a validação do experimento de hipóxia direta com experimentos de RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) para 4 genes, utilizando duas réplicas biológicas independentes. As sequências dos oligonucleotídeos utilizados estão mostradas na **Tabela 1** (seção 4.13). Como normalizador, também foi utilizado o gene BeE60H30A07, assim como na validação de hipóxia gradual. Como pode ser observado na **Figura 21**, a seguir, a comparação direta entre as duas metodologias mostra que elas foram qualitativamente coincidentes, o que valida os resultados obtidos no microarranjo.

Figura 21: Validação dos microarranjos de cDNA de Hipóxia Direta por RT-PCR quantitativo. Nas ordenadas estão mostradas as razões de expressão e nas abscissas as

condições de oxigênio dissolvido. As barras verticais representam os desvios-padrão das análises realizadas em duplicata biológica.

5.2 Análise metabolômica em hipóxia por Eletroforese Capilar

5.2.1 Preparação das Amostras

B. emersonii foi cultivada nas mesmas condições do experimento de hipóxia gradual (seção 4.6) e foram retiradas alíquotas de normóxia (C70), anóxia (C0) e reoxigenação (C70r). Para conseguirmos uma quantidade razoável de metabólitos para os experimentos de eletroforese capilar, foi necessário realizar um experimento para cada ponto analisado (C70, C0 e C70r) e retirar toda a massa de células para a preparação dos extratos. Como cada ponto foi feito em triplicata biológica, realizamos 9 experimentos no total, para a análise dos metabólitos catiônicos.

5.2.2 Quantificação de proteínas totais

Para podermos igualar as diluições dos extratos metabólicos de *B. emersonii*, de acordo com a concentração de proteínas totais, quantificamos as proteínas totais dos extratos pelo método de Bradford, antes da filtragem que elimina proteínas (seção 4.14.3).

Primeiramente foi construída uma curva-padrão de BSA, através da qual a concentração de proteína nos extratos foi calculada (**Tabela 4**). As amostras foram nomeadas de acordo com a condição de oxigênio dissolvido (C70, C0 ou C70r), com a réplica biológica (numeradas de 1 a 3). O volume final de solubilização foi calculado de modo a manter iguais as concentrações de proteínas nas amostras.

Tabela 4: Quantificação de proteínas totais nos extratos metabólicos de *B. emersonii*. As amostras foram nomeadas de acordo com a condição de oxigênio dissolvido (C70, C0 ou C70r), com a réplica biológica (numeradas de 1 a 3). O volume final de solubilização foi calculado de modo a manter iguais as concentrações de proteínas nas amostras.

Amostra	proteínas totais (µg/µL)	volume para solubilizar (µL)	conc. final proteínas (µg/µL)
C70-1	0.0951	189.68	1.55
C70-2	0.0876	174.79	1.55
C70-3	0.0853	170.20	1.55
C0-1	0.0894	178.22	1.55
C0-2	0.0501	100.00	1.55
C0-3	0.0968	193.12	1.55
C70r-1	0.1141	227.51	1.55
C70r-2	0.1124	224.07	1.55
C70r-3	0.1371	271.59	1.55

5.2.3 Análise de metabólitos catiônicos por CE-MS

Nesta análise foi possível identificar 18 metabólitos catiônicos de *B. emersonii*, sendo 17 aminoácidos e glutatona total. Alguns aminoácidos como Leucina/Isoleucina e Glutamina/Lisina possuem massas muito próximas e, por isso, foram analisados em conjunto. Não foi possível obter a concentração absoluta desses metabólitos nas amostras, mas sim uma quantificação relativa a um padrão interno de triptofano marcado com dois carbonos ^{13}C , que foi adicionado às amostras na concentração de 0,04 mg/ml, antes das análises.

Devido à complexidade das vias do metabolismo de aminoácidos, fica difícil correlacionar a regulação da expressão dos genes que codificam enzimas do metabolismo de aminoácidos com as variações nas concentrações intracelulares destas moléculas. No entanto, tentaremos tecer algumas considerações. Como se pode observar na **Figura 22**, tentamos comparar as áreas relativas dos aminoácidos em três pontos do experimento de hipóxia gradual: normóxia (C70), anóxia (C0) e reoxigenação (C70r).

Não houve variação significativa na concentração de quatro aminoácidos (metionina, prolina, fenilalanina e triptofano). Já os aminoácidos glutamato e aspartato tiveram suas concentrações intracelulares ligeiramente diminuídas por hipóxia, seguidas de uma recuperação na reoxigenação. Como foi observado na seção 5.1.7.2, o gene da enzima glutamato desidrogenase 3 está reprimido em condições de hipóxia e, por esta razão seria intuitivo dizer que o glutamato deveria se acumular. Por outro lado, também foi observada a indução dos genes da delta-1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase e da glutamina sintetase, enzimas que utilizam glutamato para a síntese de prolina e glutamina, respectivamente, condizendo com a diminuição da concentração de glutamato nas células.

Os aminoácidos leucina/isoleucina, asparagina, tirosina e cisteína apresentaram um acúmulo nas células submetidas à hipóxia. Se observarmos os dados de microarranjos dos genes responsáveis pela biossíntese leucina (2-isopropilmalato sintase e acetolactato sintase *Ilv2*), isoleucina (acetolactato sintase *Ilv2*) e cisteína (cisteína sintase) (seção 5.1.7.2), vemos que eles apresentam-se reprimidos em condições de hipóxia. Provavelmente a repressão destes genes se deve a um mecanismo de “feedback” negativo causado pelo acúmulo dos aminoácidos em hipóxia.

As análises do metabólitos aniônicos, que compreendem os intermediários da via glicolítica e ciclo do ácido cítrico, que ainda estão sendo finalizadas e não puderam ser incluídas nesta tese, serão fundamentais para o entendimento mais profundo do redirecionamento metabólico de *B. emersonii* em condições de hipóxia.

Figura 22: Análise de aminoácidos livres intracelulares por CE-MS. Os resultados são expressos como área do pico relativa ao padrão interno de Triptofano marcado com dois carbonos isótopos (^{13}C -Trp). As amostras proveem de experimentos de hipóxia gradual (seção 4.6) em que foram retiradas alíquotas de normóxia (C70), anóxia (C0) e reoxigenação (C70r).

5.3 Carência de Ferro (II)

5.3.1 Análise dos genes cuja expressão é afetada pela carência de ferro (II)

Como já foi dito anteriormente, sabe-se que quelantes de ferro (II) como 2,2'-dipyridyl, são conhecidos agentes mimetizadores de hipóxia através da estabilização de HIF-1 α (Semenza, 2007). Por esta razão, decidimos realizar uma comparação entre as respostas transcricionais globais de células submetidas à hipóxia e carência de ferro (II), e assim tentar encontrar alguma correlação entre estes dois estresses.

No experimento de carência de ferro (II) (seção 4.9) nós comparamos as populações de transcritos dos 3773 genes presentes nos microarranjos, de células cultivadas em

normóxia (70% sat.O₂), coletadas logo antes com células coletadas 1 hora após a adição de 150 μ M do quelante de ferro 2,2'-dipyridyl (DPY). Dentre os ESTs analisados, 2435 (64.5%) se mostraram expressos nos microarranjos e 219 (5.8%) foram diferencialmente expressos (Tabela S 2). A Figura 23, a seguir, ilustra a distribuição destes 219 genes classificados manualmente em categorias funcionais.

Figura 23: Genes induzidos ou reprimidos durante carência de ferro (II), distribuídos em categorias funcionais.

5.3.2 Comparação com Hipóxia

Numa análise comparativa observa-se que, dentre os 219 genes diferencialmente expressos, 112 (51.1%) também foram diferencialmente expressos em hipóxia gradual e/ou direta e,

surpreendentemente, 79% deles (88 genes) foram condizentes com os perfis de indução ou repressão observados em hipóxia.

A **Tabela 5**, a seguir, mostra os genes afetados por carência de ferro (II), que apresentam alguma similaridade com sequências depositadas no GenBank e/ou SwissProt, e sua comparação com os genes afetados por hipóxia gradual e/ou direta. A lista completa, contendo os *No Matches* e proteínas hipotéticas sem função conhecida, pode ser consultada no Material Suplementar (**Tabela S 2**).

Tabela 5: Lista de genes afetados por carência de Ferro (II) obtidos pela técnica de microarranjo de cDNA e a comparação com os microarranjos de hipóxia gradual e/ou direta. Os valores representam a razão de expressão (teste/controle). As setas indicam os perfis de indução (para cima) ou repressão (para baixo).

Clone ID	SwissProt	Anotação	Carência de Fe ²⁺	Perfil em HG/HD	Hipóxia Direta				Hipóxia Gradual							
					C1_1h	C1_5h	C70r_1h	Kmeans HD	C70	C35	C17.5	C5	C1	C0	C70r	Kmeans HG
Metabolismo de Aminoácidos																
BeG90N11B07		acetolactate synthase Ilv2 [Filobasidiella neoform	0.3													
BeG30N08D01	Q9Y3D8	Adenylate kinase isoenzyme 6	0.5	↓	0.9	0.6	0.9	4	1.0	1.0	1.0	0.9	0.6	0.6	1.1	2
BeG60N02D07		glycine cleavage system H protein (16.0 kD)	0.5						1.0	1.0	0.8	1.0	1.0	1.0	0.6	5
BeE60N17D10		asparagiNyl tRNA Synthetase NRS-1 (61.2 kD) (nrs-1	0.6													
BeE60H21G01		homogentisate 1,2-dioxygenase	0.6						1.0	1.4	1.2	1.3	0.9	1.0	0.9	4
BeE60H28B12	Q96VZ6	Acetolactate synthase Ilv2	0.6	↓	0.4	0.5	2.9	1	1.0	1.2	1.5	1.3	0.3	0.3	1.5	1
BeE30N02B01	O04974	2-isopropylmalate synthase B	0.6													
Ciclo Celular																
BeE120N28B12	Q9C1M3	Septin	0.6													
BeE60H26C08	Q9P3A7	Cell division cycle protein 48 homolog	1.7						1.0	0.9	0.9	1.1	0.9	1.0	0.7	5
Estrutura de Cromatina																
BeG30N17G05	Q1469	programmed cell death 11	0.6	↓	0.9	0.7	0.9	4								
Metabolismo Energético																
BeE90D08B03		glycogen storage control protein, putative [Cryptococcus	0.3													
BeE120N27B02	P56205	Cytochrome c	0.3	↓	0.6	0.7	1.0	1	1.0	0.9	0.9	0.9	0.5	0.3	1.4	1
BeG120N23E11	Q99L23	NADH dehydrogenase (Fragment)	0.3													
BeG120N07H08	O74699	Aconitase	0.4	↓					1.0	0.9	0.8	0.9	1.0	0.8	1.4	2
BeE120N27B03	Q03015	NADH-ubiquinone oxidoreductase 12 kDa subunit	0.5	↓					1.1	0.8	0.9	0.9	0.8	0.7	1.0	2
BeZSPN09F10	Q8J267	Aconitase (Fragment)	0.5													
BeE120N08B02		aconitase 2, mitochondrial [Danio rerio]	0.5													
BeE120N20G02	O97725	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit B17.	0.6													
BeG30N12E07	Q9P8D2	Cytochrome c oxidase subunit V	0.6	↑	1.4	1.2	0.9	5								
BeE120N37A09	Q7SGS6	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit precursor	0.6													
BeG90N12C05		glutaryl-Coenzyme A dehydrogenase isoform a	0.6	↓					1.0	1.0	0.9	0.7	0.6	0.4	0.9	2
BeG30N06H08		Isocitrate lyase (Isocitrase) (Isocitratase) (ICL)	0.6													
BeG90N18D03		Similar to cytochrome c-1 [Xenopus laevis]	0.7													
BeG120N10C03		NADH-ubiquinone oxidoreductase 30.4 kDa subunit	0.7													
BeE120N01B06	P17568	NADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit	0.7													
BeE120N01B08		NADH-ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit	0.7													
BeG60N09E05	P52504	NADH-ubiquinone oxidoreductase 13 kDa-A sub	0.7													
BeE60H08E04	Q9A212	Quinone oxidoreductase	1.6	↑	1.2	1.5	1.0	3								
BeE60N10B03		vacuolar ATP synthase subunit c''	1.6	↑	2.1	1.3	0.9	5	0.9	1.2	1.1	1.4	2.3	2.2	0.8	6
BeE30N03G09	Q7PRL2	V-type ATPase proteolipid subunit	1.6													
BeE120N28B05	P48826	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1.6													
BeE60N05D05	Q8EBH2	Transaldolase	1.8	↑	1.5	1.5	1.0	3	1.1	1.0	1.0	1.2	1.6	3.1	0.8	6
BeE30N04H06	Q9Z2K9	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	1.8	↓					1.1	1.3	1.2	1.1	0.6	0.8	1.0	2
BeE60N18F02	P48826	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1.8													
BeE30N21H07	P06738	Glycogen phosphorylase	2.0	↑	1.3	2.0	1.0	3	1.1	1.1	0.9	1.2	1.4	1.7	0.7	6
BeG90N11A02	Q90WD9	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	2.2	↑	1.9	2.4	1.2	3	1.0	1.4	1.3	2.0	2.3	2.6	0.9	7
Metabolismo de Lipídeos																
BeE90D17G07	Q9P4D7	Long chain polyunsaturated fatty acid elongation	1.4		0.6	1.0	0.8	1	1.0	1.0	1.1	1.4	1.2	1.3	0.6	6

		enzyme																	
BeE60H26A05	Q872A4	Related to phosphatidylserine decarboxylase	1.7	↑	5.0	2.6	1.0	6	0.9	1.8	2.5	6.1	15.8	12.6	2.7	7			
BeG90N07B07	Q7Q192	leukotriene A4 hydrolase	1.7	↑	1.6	1.1	0.7	5											
BeE60N03G10	Q7SBV0	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	1.9	↑					1.1	1.8	1.5	3.8	8.9	5.7	2.0	7			
BeZSPN11E04		deoxyhypusine hydroxylase	2.5																
BeZSPN15E12		deoxyhypusine hydroxylase/monooxygenase	3.4																
Metabolismo de Ácidos Nucleicos																			
BeE90D15C05	O94413	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	0.5	↑	1.9	1.7	1.3	3	1.1	0.9	0.9	0.9	1.4	1.7	0.9	6			
BeG30N12D07	O93937	PyrABCN	0.5	↓	0.7	1.2	2.0	1	1.0	0.7	0.4	0.7	0.6	0.8	0.9	2			
BeG30N04E02	P50094	Probable inosine-5'-monophosphate dehydroge	0.6																
BeZSPN03F10		probable inosine-5'\-monophosphate dehydrogenase	0.6	↑	1.1	1.5	1.4	3											
Enovelamento e Modificação de Proteínas																			
BeE120N06B11	Q8CEE6	PAS domain containing serine/threonine kinase	0.3																
BeG30N13C06		Ribosomal RNA processing protein 28	0.5	↓					0.9	1.1		0.9		0.6	1.0	2			
BeE30N18D09	Q8UGX7	Peptide methionine sulfoxide reductase msrB	0.6																
BeE30N03D10	P25007	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1.4																
BeE30N21E09	Q7ZWL1	Similar to prolyl endopeptidase (Fragment)	1.4																
BeE60H28G06	O73817	Proteasome subunit beta type 3	1.5																
BeE60H23C11	Q9W227	similar to peptidylprolyl isomerase B isoform 1	1.5																
BeE60N10D10		proteasome subunit alpha type-4	1.5																
BeG120N08G03	Q13200	26S proteasome non-ATPase regulatory subuni	1.5																
BeE60N15G05		DnaJ-like protein MsJ1 - alfalfa	1.6	↑	1.6	1.2	1.0	5	1.1	1.1	1.3	1.4	2.4	2.7	0.8	7			
BeE60N13G06	Q96U28	Probable 26s proteasome p44.5 protein	1.7																
BeG30N09H07	P52493	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa	1.8																
BeE60H17C06	P52495	Ubiquitin-activating enzyme E1 1 (Fragment)	1.8	↑					1.0	1.1	1.1	1.4	1.1	1.1	0.7	6			
BeE90D05G05	Q7Z8F2	Putative serine/threonine phosphatase 2C ptc2	1.8	↑	2.3	1.9	0.9	5	1.0	1.3	1.5	2.2	4.9	4.8	0.9	7			
BeZSPN13B02	Q9HF04	Vacuolar serine protease	1.9																
BeG90N22C02	Q9PTW9	Proteasome subunit alpha type 7	1.9																
BeE60N14C07	O14413	Proteinase A	2.2																
Homeostase Redox																			
BeE60N14F11	Q9BGI3	Peroxiredoxin 2	1.3	↑					0.7	1.1	1.2	1.3	1.3	1.3	1.1	6			
BeE90D16C06	P91252	Probable glutathione S-transferase 6	1.4																
BeE60C04G01	O14463	Thioredoxin	1.5																
BeE60C31E12	Q94GY8	Putative glutathione S-transferase	2.0																
BeE120N37A02	Q94GY8	Putative glutathione S-transferase	2.1																
BeE60H11C04	Q7YXM3	peroxiredoxins [Phanerochaete chrysosporium]	3.2																
BeE60C19G01		Thioredoxin peroxidase	3.4	↓	0.6	1.1	1.0	1											
Proteínas Ribossômicas / Tradução																			
BeG60N15D01	O7469	SNU13 snRNP subunit homolog	0.3	↓	0.6	0.5	0.9	1	1.0	0.9	0.9	0.8	0.4	0.2	1.2	1			
BeG90N10A10	P32495	High mobility group	0.4	↓		0.5	0.9		1.0	1.0	0.9	0.9	0.5	0.4	1.2	2			
BeG120N20E02	Q9NPE3	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3	0.4	↓	0.4	0.4	0.9	2	0.9	0.9	1.1	0.9	0.3	0.3	1.3	2			
BeG120N02A10	Q09916	Putative ATP dependent RNA helicase C1F7.02	0.4	↓	0.6	0.6	0.9	1	1.0	1.0	0.9	0.9	0.4		1.1	1			
BeG120N22A08	P38805	Ribosome biogenesis protein RPF1	0.5																
BeG90N04A04		Probable eukaryotic translation initiation factor	0.5	↓	0.6	0.7	1.1	1											
BeZSPN17H02		similar to Fibrillarin CG9888PA	0.6	↓					1.0	1.0	0.9	0.9	0.5	0.4	1.1	2			
BeG90N19G08	Q8S1Z1	U3 small nucleolar RNA-associated	0.6																
BeG120N04E02		H. sapiens eukaryotic translation initiation factor 1A	0.7	↓					0.9	0.9	0.9	0.8	0.7	0.6	1.0	2			
BeE90N16A07	Q7MXM0	Aspartyl-tRNA synthetase	1.8																
BeE90D07H12	P25444	40S ribosomal protein S2	1.8																
Transdução de Sinal																			
BeE90D03C08	Q8BWJ3	Phosphorylase B kinase alpha regulatory chain, liver isoform	0.7																
BeZSPN16D09	Q12741	cAMP-dependent protein kinase catalytic sub	1.4	↑	1.2	1.4	1.3	3											
BeG90N08A02	Q9W711	activated protein kinase C receptor	1.5	↑	0.9	1.4	1.1	3											
Resposta a Estresse																			
BeG60N07C03	Q9S9N1	Hsp70-3 (Blastocladiella emersonii)	0.7	↓					1.1	1.0	0.8	0.8	0.6	0.7	1.0	2			
BeE60H30A07	Q8I8Z4	Heat shock protein 90 (Fragment)	1.6																
Estrutura Celular / Microtúbulos																			
BeE90N19F03	Q8WXX0	Ciliary dynein heavy chain 7	0.5																
BeE60N10H11		kinesin heavy chain	0.6																
Transcrição / Processamento de RNA																			
BeG90N10B01		DNA-directed RNA polymerase I subunit D protein	0.5	↓	0.6	0.6	1.0	1	0.9	1.0	0.9	0.9	0.5	0.5	1.3	2			

BeE30N22H05	O81098	RNA polymerase I, II and III 24.3 kDa subun	0.6	↓	0.2	0.7	1.0	2									
BeE90D08E03	P34253	RNA polymerase II elongator-associated protein	1.9	↑	2.1	1.7	0.9	5	1.0	1.2	1.5	2.0	3.9	4.5	0.9	7	
Transporte																	
BeG60N20F09	Q87216	Probable iron inhibited ABC transporter 2 G	0.4	↓	0.7	0.7	1.0	1	1.0	1.0	1.1	1.0	0.7	0.7	1.4	2	
BeZSPN05F06		hypothetical protein [Neurospora crassa]	0.5	↓					1.0	1.0	1.0	0.9	0.7	0.8	1.5	2	
BeE60C03A02		Cation/multidrug efflux pump [Pseudomonas	0.6														
BeE60N18C10		Acyl carrier protein, mitochondrial precursor (ACP	0.6														
		putative phosphate/phosphoenolpyruvate															
BeE60N18A11		translocator	0.7	↓					1.0	1.0	0.9	1.0	0.8	0.6	0.8	2	
BeNSVP07B10		proton glutamate symport protein	1.4	↑	0.9	1.6	1.0	3	0.8	0.8	1.0	1.2	1.4	1.8	1.0	6	
BeG60N01F09		methionine permease, putative [Neosartorya fischeri]	1.8	↑	1.6	2.1	0.9	3									
BeE60N12D06	Q9JL62	Glycolipid transfer protein	2.0	↑	2.3	1.7	1.1	5	1.0	1.3	1.3	1.9	2.8	2.8	1.0	7	
BeG30N13H08	Q9JL97	GPI-anchored ceruloplasmin	2.5						1.1	1.0	1.1	0.8	0.6		0.7	5	
BeZSPN15C05		high-affinity iron permease [Rhizopus oryzae]	2.7	↓						0.9		0.8		0.6	0.5	2	
BeG90N02G07	Q8JZT2	S-adenosylmethionine mitochondrial carrier protein	2.7														
BeG30N20G10		ABC transporter-like protein [Arabidopsis thaliana]	3.3														
BeG120N25D02	Q92341	siderophore iron transporter mirC	4.9														
BeG30N19E11		zinc/iron permease	8.9						1.0	1.6	1.1	0.5	0.6	1.0	0.6	5	
Outros																	
BeE90N06H03	Q81CV0	Hydrolase	0.2	↓		0.1				0.4	0.7	0.2		0.3	1.2	8	
BeE60C18D04	Q8FW89	Quinone oxidoreductase	0.2														
BeNSVP04C06	P19727	Minor capsid protein 10B	0.3														
BeG30N20D08	Q9UUG1	Brix domain containing protein 1 homolog	0.3	↓	0.5	0.7	1.0	1	0.9	1.2	0.9	0.9		0.4	1.2	1	
BeG60N08E04	O42468	PP2A inhibitor	0.4	↓	0.5	0.6	1.0	1	1.0	1.1	0.7	0.8	0.3	0.3	1.2	1	
BeE60C21A11	Q88FF9	Outer membrane siderophore receptor	0.4														
BeG60N12C05	Q9BQ67	Glutamate-rich WD-repeat protein 1	0.5														
BeG90N07D08	Q8EIN1	Alkaline phosphatase, putative	0.5														
BeE60C15B06		Fe2+-dicitrate sensor	0.6	↓	0.3	0.9	0.8	2									
BeZSPN14H05		histidinol phosphate aminotransferase	0.6	↓	0.7	1.0	1.4	1	1.0	0.7	0.7	0.7	0.3	0.2	0.7	1	
BeE60N16C10		fiber protein Fb27 [Gossypium barbadense]	0.7	↓	0.1	0.9	0.9	2									
BeG30N10H02		zinc finger, HIT type 6	0.7														
BeE60C05B10	Q882A7	Oxidoreductase, Gfo/Iah/MocA family	0.7	↓	0.5	0.7	0.9	1									
BeG30N18H02	O14236	gtp-binding protein associated	0.7														
BeE60C06H06	Q7WWT9	Putative NagM-like protein	0.7	↓	0.7	0.7	0.8	4									
BeG120N02B04	P32469	Diphthine synthase	0.7	↓	0.5	0.5	0.9	1	1.0	1.0	0.8	0.9	0.5	0.4	1.1	1	
BeG120N23D09		putative protein disulfate isomerase	1.5	↑	1.5	1.8	1.1	3	1.0	1.2	1.2	1.5	1.9	1.6	0.8	6	

Embora nem todos os genes cuja expressão é alterada por hipóxia sejam também afetados por tratamento com DPY, as categorias funcionais observadas apresentaram comportamento semelhante nos dois casos, indicando que carência de Fe^{2+} e hipóxia compartilham respostas transcricionais semelhantes, tanto no que diz respeito individualmente aos genes, quanto a processos fisiológicos como um todo.

No Metabolismo de Aminoácidos, por exemplo, todos os genes afetados se apresentaram reprimidos pela carência de ferro, seguindo a tendência observada nos experimentos de hipóxia (seção 5.1.7.2).

No Metabolismo Energético, observamos a repressão de genes relacionados à cadeia respiratória (*NADH-ubiquinone oxidoreductase*, *cytochrome c* e *Cytochrome c oxidase subunit V*) e ciclo do ácido cítrico (*aconitase*, *succinate dehydrogenase* e *isocitrate lyase*) e indução de genes relacionados ao metabolismo de glicose (*Glycogen phosphorylase*, *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, *Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase* e *Transaldolase*), além de ATPases vacuolares (*vacuolar ATP synthase subunit c* e *V-type ATPase proteolipid subunit*). Apesar de nem todos os genes afetados por hipóxia estarem também afetados por carência de ferro, podemos observar que o padrão de resposta do sistema como um todo, com priorização do metabolismo glicolítico, frente ao respiratório, de certa forma foi mantido.

No Metabolismo de Lipídeos, também seguindo a tendência observada em hipóxia, todos os seis genes afetados foram induzidos, dentre os quais, três genes também induzidos por hipóxia. Devido à importância do metabolismo de lipídeos na resposta a hipóxia em outros organismos (seção 5.1.7.7), isso nos dá mais um indício de que o ferro (II) pode ter importância no sistema sensor de oxigênio em *B. emersonii*.

Quanto à Homeostase Redox, a carência de ferro parece ser mais danosa do que a hipóxia, pois se observa a indução de sete genes que codificam proteínas protetoras contra estresse redox, ao passo que em hipóxia observamos menos genes induzidos e alguns até reprimidos.

No caso da categoria Proteínas Ribossômicas / Tradução, a semelhança com a hipóxia é ainda mais evidente. Podemos observar que grande parte dos genes afetados foram reprimidos, sendo que muitos deles são os mesmos genes reprimidos em hipóxia.

Na categoria Transdução de Sinal observamos induzidos tanto em hipóxia quanto em carência de ferro, o genes que codificam a subunidade catalítica da proteína quinase dependente de cAMP (*cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit*) e o receptor da

proteína quinase C (*activated protein kinase C receptor*), indicando que este tipo de sinalização atua em ambos os estresses.

A categoria Transcrição / Processamento de RNA merece destaque, pois todos os genes afetados também aparecem no estresse de hipóxia e de maneira condizente. Dois genes codificando subunidades da RNA polimerase foram reprimidos e um gene codificando um fator de alongação da RNA polimerase foi induzido.

Na categoria Transporte, três genes que codificam transportadores de ferro foram altamente induzidos (*high-affinity iron permease*, *siderophore iron transporter mirC* e *zinc/iron permease*), o que é certamente um reflexo da carência de ferro causada pelo tratamento das células com 2,2'-dipyridyl. Além disso, diversos genes relacionados a transporte foram afetados de maneira semelhante ao observado em hipóxia, como por exemplo, foram induzidos os genes de transportadores de fosfoenolpiruvato (*phosphate/phosphoenolpyruvate translocator*), de glutamato (*proton glutamate symport protein*) e de metionina (*methionine permease*).

Em resumo, podemos concluir que as semelhanças observadas entre os perfis transcricionais nos experimentos hipóxia e de carência de Fe^{2+} , sugerem que estes estresses estão de alguma forma conectados, fornecendo bons indícios de que o íon Fe^{2+} possa ter papel importante no mecanismo sensor de oxigênio e/ou de resposta a hipóxia em *B. emersonii*.

5.3.3 Validação dos Microarranjos de cDNA

Os microarranjos de carência de ferro (II) também foram validados por qRT-PCR. Desta vez utilizamos como normalizador o gene BeE60H06B09 que codifica a histona H2A, H2A, pois este não se apresentou afetado por carência de ferro (II) nos microarranjos. Pode-

se observar na que as duas metodologias são qualitativamente coincidentes, o que valida os resultados de microarranjo.

Figura 24: Validação dos experimentos de microarranjos com células em Carência de Ferro por RT-PCR quantitativo. As barras verticais representam os desvios-padrão das análises realizadas em duplicata biológica.

5.4 Genes regulados por hipóxia, carência de Fe^{2+} , cádmio e choque térmico

Como já foi mencionado anteriormente, o projeto de sequenciamento em larga escala de clones de cDNAs de *B. emersonii*, desenvolvido por nosso laboratório, proporcionou estudos sobre expressão gênica diferencial deste fungo sob diversos tipos de diferencial deste fungo sob condições de estresse, como exposição a cádmio (Cd^{2+}) e a choque térmico (Georg and Gomes, 2007). Nestes estudos também foi mostrado que uma grande quantidade

de genes “No matches”, ou seja, sem qualquer similaridade no banco de dados do GenBank, são regulados por estes estresses.

A fim de procurarmos potenciais funções para estes genes sem função conhecida, realizamos uma análise comparativa entre os genes diferencialmente expressos tanto nos estresses por cádmio e choque térmico, quanto nos estresses por hipóxia e carência de ferro (II), obtidos no presente trabalho (**Tabela 6**). Podemos observar nesta tabela que cinco genes foram diferencialmente expressos nos quatro tipos de estresse.

Tabela 6: Genes regulados por hipóxia, carência de Fe^{2+} , cádmio e choque térmico. Os resultados de cádmio e choque térmico foram obtidos por nosso grupo de pesquisa (Georg and Gomes, 2007). Os valores representam a razão de expressão (teste/controle). Os dados de cádmio foram obtidos em duas concentrações de metal (100 e 200 μM) e, assim como em choque térmico, foram adquiridos tanto em células de esporulação (E) quanto de germinação (G).

Clone ID	SwissProt	Anotação	Fe(II)	Hipóxia Direta				Hipóxia Gradual						Cádmio				Choque térmico	
			DPY_150	C1_1h	C1_5h	C70r_1h	C70	C35	C17.5	C5	C1	C0	C70r	Cd_E100	Cd_E200	Cd_G100	Cd_G200	HS_E	HS_G
BeE60H26A05	Q872A4	Related to phosphatidylserine decarboxylase	1.7	5.0	2.6	1.0	0.9	1.8	2.5	6.1	15.8	12.6	2.7	6	10			3	4
BeE60C19G01		Thioredoxin peroxidase	3.4	0.6	1.1	1.0										3		2	3
BeE60H15D02		No match	1.7	0.6	1.1	0.8	1.0	0.9	0.9	1.1	0.6	0.8	0.7			5	5	4	3
BeE30N20B08		No match	2.4	1.7	1.7	1.0	1.0	1.3	1.5	2.4	2.4	3.2	1.1	4	5			4	
BeE60H26C07		No match	4.1						1.1	1.1			2.4			2	2	5	4

O gene que codifica uma provável fosfatidilserina descarboxilase (*phosphatidylserine decarboxylase*), enzima formadora de fosfatidiletanolamina e participante da biossíntese de fosfolípidos, é bastante induzido em todos os estresses. De fato, o aumento da proporção de fosfatidiletanolamina na membrana leva a um aumento de sua fluidez, o que poderia contribuir para a tolerância aos diferentes estresses. A mesma indução foi observada para dois genes “No matches” (BeE30N20B08 e BeE60H26C07),

indicando que estes genes devem possuir um papel importante na resposta geral a estresses, em *B.emersonii*. O gene que codifica a enzima tiorredoxina peroxidase (*thioredoxin peroxidase*) e o “No match” BeE60H15D02 foram induzidos somente em carência de Fe²⁺, cádmio e choque térmico, porém reprimidos em hipóxia gradual e direta.

5.5 Hipóxia + Geldanamicina

Como foi mencionado anteriormente (seção 2.2), em mamíferos, a HSP90 possui um papel protetor de HIF-1 α em relação à sua degradação pelo proteassomo de maneira O₂/PHD/VHL-independente. Apesar de não se ter encontrado até o momento nenhum homólogo de HIF-1 α em *B. emersonii*, dois cDNAs codificando HSP90 distintas foram recentemente caracterizados (Pugliese *et al.*, 2008). Na busca de evidências de um mecanismo similar ao HIF-1 neste fungo, comparamos através da técnica de microarranjos, a população de transcritos de células tratadas e não-tratadas com 2 μ M geldanamicina, um inibidor da HSP90, ambas a células submetidas a uma hora de hipóxia direta (seção 4.10). Assim, tomando como condição controle as células não-tratadas esperava-se que genes regulados por um suposto fator HIF1- α , deveriam estar regulados negativamente, pois a falta de HIF1- α estável mesmo em condições de hipóxia, uma vez que a inibição de HSP90 leva a uma constante degradação deste fator, independentemente de oxigênio.

De fato, encontramos 111 genes regulados negativamente quando as células sob hipóxia foram tratadas com geldanamicina. No entanto, somente 12 destes genes foram encontrados induzidos nos experimentos de hipóxia gradual e/ou direta (**Tabela 7**). Os outros genes foram provavelmente afetados por alterações transcricionais causadas pela geldanamicina, independentemente de hipóxia. A tabela completa, contendo todos os genes diferencialmente expressos neste experimento, é mostrada no Material Suplementar (**Tabela S 3**).

Tabela 7: Genes de hipóxia afetados pelo tratamento com geldanamicina. Valores expressos em número de vezes reprimido. As setas indicam os perfis de expressão dos experimentos de hipóxia gradual e/ou direta.

Clone ID	SwissProt	Anotação	Repressão por Geldanamicina	Perfil em HG e/ou HD
Metabolismo Energético				
BeE60N05D05	Q8EBH2	Transaldolase	-1.6	↑
BeG90N18E08	Q8X97	Probable ATP-citrate synthase subunit 1	-1.7	↑
BeE120N03E01	Q8ZN3	D-lactate dehydrogenase	-1.4	↑
Metabolismo de Lipídeos				
BeE60H26A05	Q872A4	Related to phosphatidylserine decarboxylase	-1.6	↑
BeG60N06G05	P7978	Delta-9 fatty acid desaturase	-2.0	↑
BeG90N07B07		leukotriene A4 hydrolase	-1.5	↑
Estrutura Celular / Microtúbulos				
BeE60N13F03		beta-tubulin [Blastocladiella emersonii]	-1.4	↑
Transporte				
BeG90N07C10	Q8TGD1	tricarboxylate carrier, putative	-5.8	↑
No Match				
BeE60N01B04		No match	-1.7	↑
BeE90D14D07		No match	-1.9	↑
BeE60N18B07		No match	-1.4	↑
BeE60H08F12		No match	-1.7	↑

É interessante notar que alguns dos genes de hipóxia afetados pelo tratamento com geldanamicina codificam proteínas de destacada importância para o estresse de hipóxia, como já foi mencionado anteriormente (seção 5.1.7). A expressão de quatro destes genes foi confirmada por RT-qPCR e mostrou que realmente a sua indução por hipóxia é diminuída quando as células são tratadas previamente com geldanamicina (**Figura 25**). Também avaliamos a expressão do gene que codifica uma anidrase carbônica putativa

(BeG30N15D05), pois em mamíferos, a anidrase carbônica é um dos principais alvos do fator HIF1- α . Sua expressão foi marcadamente induzida sob hipóxia, mas não pôde ser obtida nos microarranjos do experimento de geldanamicina devido a artefatos na lâmina.

Figura 25: Validação dos microarranjos do experimento Hipóxia + Geldanamicina. Pode-se notar que nas células submetidas à hipóxia + geldanamicina, a indução dos genes foi menor do que sem geldanamicina. As barras verticais representam os desvios-padrão das análises realizadas em duplicata biológica.

Deste modo, não resta dúvidas de que o antibiótico geldanamicina possui algum efeito sobre a expressão de genes de hipóxia em *B. emersonii*. Entretanto, esses resultados não provam que este fungo possui algum mecanismo semelhante ao HIF1- α , mas nos fornece uma pista intrigante e uma forte razão para continuarmos investigando.

5.6 Uma proteína de quitridiomiceto similar ao fator inibitório de HIF-1 α (FIH)

Não encontramos em nossa base de dados de cDNAs de *B. emersonii* (<http://blasto.iq.usp.br>) um transcrito que possua similaridade com HIF1- α . No entanto, mesmo entre os organismos que possuem este fator, ele não é muito conservado, o que torna difícil a identificação de homólogos em outras espécies.

O fungo evolutivamente mais próximo de *Blastocladiella emersonii*, com genoma seqüenciado, é o quitridiomiceto patógeno de anfíbios *Batrachochytrium dendrobatidis*. Realizamos uma busca por fatores que participam da via de HIF1- α no genoma deste fungo (disponível em www.broadinstitute.org) e encontramos uma proteína hipotética com um domínio Jmjc (BDEG_02431.1), muito similar à proteína JMJD5 de metazoários (de função desconhecida). As proteínas JMJD5 são da mesma família (“only-Jmjc-domain-containing protein”) do fator inibitório de HIF1- α (FIH) (Klose *et al.*, 2006). FIH é uma dioxigenase dependente de α -cetoglutarato, que hidroxila um resíduo de asparagina (Asp⁸⁰³) de HIF-1 α , levando à sua inativação devido ao bloqueio de sua interação com seus coativadores CBP e p300, impedindo assim, a indução de genes de hipóxia (Semenza, 2007; Taylor, 2008).

A principal diferença entre JMJD5 e o fator FIH é uma substituição de um resíduo de treonina por serina (**Figura 26**) no primeiro sítio de ligação a α -cetoglutarato (Klose *et al.*, 2006). Mesmo que ainda não se conheça a função da proteína JMJD5, o fato de existir uma proteína de quitridiomiceto com domínio tão parecido com o de FIH, nos indica que existe a chance de existir, nestes fungos, um mecanismo de homeostase de oxigênio semelhante ao do HIF-1 α .

Figura 26: Alinhamento das sequências dos domínios Jmjc da proteína hipotética de *B. dendrobatidis* (BDEG_02431.1) e das proteínas JMJD5 e FIH de metazoários. Sítios de ligação a Fe(II) (vermelho), sítios de ligação a α -cetoglutarato (azul) e resíduos conservados (preto e cinza), estão destacados em cada ortólogo para mostrar as similaridades e diferenças entre as proteínas. mm=Mus musculus; rn=Rattus norvegicus; hs=Homo sapiens; dr=Danio rerio; ic=Ictalurus punctatus; ec=equus caballus.

5.7 Transformação de *B. emersonii* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Para estabelecer uma metodologia de transformação de *Blastocladiella emersonii* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, foi construído o vetor binário pBINPLUS-Hph (seção 4.15.1), que carrega um T-DNA, o qual contém o gene de resistência a higromicina B, codificando a enzima higromicina B fosfotransferase (hph), sob controle do promotor e terminador trpC de *Aspergillus nidulans*.

Como *B. emersonii* é um fungo aquático e requer um meio úmido, não é possível observar sua resistência a higromicina B através da formação de colônias. No entanto, a sensibilidade das células a este antibiótico pode ser observada por microscopia óptica, já que células selvagens sensíveis não são capazes de crescer normalmente e nem esporular na presença do antibiótico (**Figura 27 A**).

Pudemos observar que o protocolo desenvolvido (seção 4.15.2) resultou na transferência do T-DNA presente no vetor pBINPLUS-Hph, evidenciado pelo crescimento normal e esporulação das células transformadas, na presença de higromicina B (**Figura 27 B**). Quando *B. emersonii* foi co-cultivada com *A. tumefaciens* contendo o plasmídeo pBINPLUS vazio, não houve crescimento normal e nenhum zoósporo resistente pode ser selecionado.

Figura 27: Aparência típica dos transformantes resistentes a higromicina B. **(A)** Células selvagens não transformadas, mostrando morfologia e crescimento anormais e interrupção completa da esporulação, causados pela higromicina B. **(B)** Células resistentes a higromicina B, mostrando crescimento normal e esporulação. A seta indica um dos muitos zoósporos liberados. Ambas as culturas foram feitas em meio PYG contendo $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de higromicina B.

Para termos certeza de que o T-DNA de *A. tumefaciens* foi transferido para o DNA genômico de *B. emersonii*, foi realizada uma extração rápida de DNA (seção 4.15.3) do “pool” de zoósporos resistentes após oito seleções em placas PYG contendo $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de higromicina B. O DNA genômico foi então submetido a um análise por PCR para a amplificação de um fragmento de 941 pb presente no gene de seleção hph. A **Figura 28**, a seguir, mostra que o gene marcador de resistência hph pode ser amplificado do DNA genômico de zoósporos resistentes, mas não no DNA genômico de células selvagens não transformadas, mas não do DNA genômico de células não transformadas.

A **B**

Figura 28: Análise do DNA genômico dos transformantes de *B. emersonii* por PCR. (A) Representação esquemática do cassete de resistência a higromicina B no T-DNA e a

localização dos primers utilizados. **(B)** Foto do gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, mostrando a amplificação do cassete de resistência no DNA genômico do “pool” de zoósporos resistentes. C=controle positivo (plasmídeo pBINPLUS-Hph); WT=DNA genômico de células selvagens não transformadas; R=DNA genômico do “pool” de zoósporos resistentes. Primers utilizados (de 5' a 3'): HigF - GAAAAGTTTCGACAGCGTCTCC; HigR - ACTTCTACACAGCCATCGGTC).

Infelizmente ainda não foi possível isolarmos um transformante individual estável, provavelmente devido à instabilidade da inserção do T-DNA no genoma do fungo. No entanto, nossos resultados com esta técnica mostram-se promissores e representam a primeira transformação de um Blastocladiomiceto relatada até o momento.

6 CONCLUSÕES

- Este trabalho forneceu informações importantes sobre a expressão gênica global de *Blastocladiella emersonii* em resposta ao estresse de hipóxia. Observamos que 650 foram diferencialmente expressos em pelo menos uma das condições de estresse e que 534 deles se mostraram afetados (direta ou indiretamente) pela disponibilidade de oxigênio, uma vez que apresentaram uma recuperação da expressão (ou tendência à recuperação) aos níveis normais, quando as células foram reoxigenadas. Além de modular a expressão de diversos genes sem função conhecida, *B. emersonii* parece responder à hipóxia reajustando a expressão de genes responsáveis pela produção e consumo de energia.

- Pelo menos transcricionalmente, este fungo favorece o metabolismo anaeróbico, através da indução de genes que codificam enzimas da via glicolítica e lactato desidrogenase, ao passo que no ciclo do ácido cítrico, a maioria dos genes encontra-se reprimido ou não sofre alteração na expressão. Processos dispendiosos em energia como síntese protéica, metabolismo de aminoácidos, enovelamento de proteínas e transporte por membrana apresentaram perfis predominantemente reprimidos, quando em carência de oxigênio.

- Além das alterações morfológicas, o estresse de hipóxia leva a um aumento da captação de glicose do meio de cultura pelas células de *B. emersonii*, provavelmente devido à regulação positiva de genes que codificam enzimas da via glicolítica e da lactato desidrogenase.

- A análise estatística com o aplicativo BayGO revelou que as categorias mais representadas entre os genes com perfis induzidos em hipóxia gradual e/ou direta estão relacionadas a metabolismo de carboidratos, metabolismo de quitina, estrutura celular, homeostase redox e

metabolismo de ácidos nucleicos. Dentre os genes com perfis reprimidos, as categorias mais representadas estão principalmente relacionadas a processos dispendiosos em energia, como enovelamento de proteínas, metabolismo de aminoácidos, transporte por membrana, além de processos moleculares dependentes de ligação a ATP.

- Quando comparamos a resposta transcricional de *B. emersonii* à hipóxia, com outros fungos como *Trichoderma reesei* ou *Cryptococcus neoformans*, observamos que a principal diferença encontrada consiste no metabolismo energético. Enquanto *B. emersonii* parece re-direcionar seu metabolismo aeróbico para anaerobiose (fermentação), em *Cryptococcus neoformans* o metabolismo energético parece não ser muito regulado por hipóxia e em *Trichoderma reesei* ocorre uma drástica repressão da transcrição da maioria dos genes codificando enzimas tanto da via glicolítica quanto do ciclo do ácido cítrico. Este “Efeito Pasteur” observado transcricionalmente em *B. emersonii* assemelha-se mais ao que é observado em *S. cerevisiae* e em células de mamíferos submetidas à hipóxia. Como *S. cerevisiae* é um organismo anaeróbio facultativo, sugerimos que *B. emersonii* seja uma modelo de estudo mais conveniente para comparações com mamíferos.

- Mostramos que as semelhanças observadas entre os perfis transcricionais nos experimentos hipóxia e de carência de Fe^{2+} , sugerem que estes estresses estão de alguma forma conectados, nos dando bons indícios de que o íon Fe^{2+} tem algum papel importante no mecanismo sensor de oxigênio e/ou de resposta a hipóxia em *B. emersonii*.

- O tratamento prévio de células submetidas à hipóxia com o antibiótico geldanamicina, um conhecido inibidor da HSP90, levou à diminuição da indução de certos genes de hipóxia,

indicando que este fungo pode possuir algum mecanismo semelhante ao HIF1- α de mamíferos, que também é afetado por geldanamicina.

- Desenvolvemos um protocolo para transformação de *B. emersonii* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* que se mostrou promissor. A transferência do T-DNA contendo um gene de resistência a higromicina B, presente no vetor pBINPLUS-Hph, foi evidenciada pelo crescimento normal e esporulação das células transformadas, na presença do antibiótico e pela amplificação do gene de resistência no DNA genômico de células transformadas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexandre, H., Rousseaux, I., and Charpentier, C. (1994) Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol Lett* **124**: 17-22.
- Ausbel, F.M. (1992) Short Protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current Protocols in Molecular Biology. Vol. 1 New York: Greene Pub Associates; Wiley.
- Azad, P., Zhou, D., Russo, E., and Haddad, G.G. (2009) Distinct mechanisms underlying tolerance to intermittent and constant hypoxia in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* **4**: e5371.
- Bartolini, E., Frigimelica, E., Giovinnazzi, S., Galli, G., Shaik, Y., Genco, C., Welsch, J.A., Granoff, D.M., Grandi, G., and Grifantini, R. (2006) Role of FNR and FNR-regulated, sugar fermentation genes in *Neisseria meningitidis* infection. *Mol Microbiol* **60**: 963-972.
- Becerra, M., Lombardia-Ferreira, L.J., Hauser, N.C., Hoheisel, J.D., Tizon, B., and Cerdan, M.E. (2002) The yeast transcriptome in aerobic and hypoxic conditions: effects of *hap1*, *rox1*, *rox3* and *srb10* deletions. *Mol Microbiol* **43**: 545-555.
- Bidmon, B., Endemann, M., Muller, T., Arbeiter, K., Herkner, K., and Aufricht, C. (2000) Heat shock protein-70 repairs proximal tubule structure after renal ischemia. *Kidney Int* **58**: 2400-2407.
- Bonaccorsi, E.D., Ferreira, A.J., Chambergo, F.S., Ramos, A.S., Mantovani, M.C., Farah, J.P., Sorio, C.S., Gombert, A.K., Tonso, A., and El-Dorry, H. (2006) Transcriptional response of the obligatory aerobe *Trichoderma reesei* to hypoxia and transient anoxia: implications for energy production and survival in the absence of oxygen. *Biochemistry* **45**: 3912-3924.
- Breunig, K.D., Bolotin-Fukuhara, M., Bianchi, M.M., Bourgarel, D., Falcone, C., Ferrero, I.I., Frontali, L., Goffrini, P., Krijger, J.J., Mazzoni, C., Milkowski, C., Steensma, H.Y., Wesolowski-Louvel, M., and Zeeman, A.M. (2000) Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enzyme Microb Technol* **26**: 771-780.
- Bundock, P., den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A., and Hooykaas, P.J. (1995) Transkingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **14**: 3206-3214.
- Cao, P., and Moini, M. (1998) Analysis of peptides, proteins, protein digests, and whole human blood by capillary electrophoresis/electrospray ionization-mass spectrometry using an in-capillary electrode sheathless interface. *J Am Soc Mass Spectrom* **9**: 1081-1088.
- Carratu, L., Franceschelli, S., Pardini, C.L., Kobayashi, G.S., Horvath, I., Vigh, L., and Maresca, B. (1996) Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 3870-3875.
- Castello, P.R., David, P.S., McClure, T., Crook, Z., and Poyton, R.O. (2006) Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metab* **3**: 277-287.
- Chang, W., Song, B.W., Lim, S., Song, H., Shim, C.Y., Cha, M.J., Ahn, D.H., Jung, Y.G., Lee, D.H., Chung, J.H., Choi, K.D., Lee, S.K., Chung, N., Jang, Y., and Hwang, K.C. (2009) Mesenchymal stem cells pretreated with delivered hph-1-hsp70 protein

- are protected from hypoxia-mediated cell death and rescue heart functions from myocardial injury. *Stem Cells* **27**: 2283-2292.
- Chang, Y.C., Bien, C.M., Lee, H., Espenshade, P.J., and Kwon-Chung, K.J. (2007) Sre1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **64**: 614-629.
- Chen, X., Stone, M., Schlagnhauser, C., and Romaine, C.P. (2000) A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4510-4513.
- Chun, C.D., Liu, O.W., and Madhani, H.D. (2007) A link between virulence and homeostatic responses to hypoxia during infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog* **3**: e22.
- Cleveland, D.W., and Sullivan, K.F. (1985) Molecular biology and genetics of tubulin. *Annu Rev Biochem* **54**: 331-365.
- Connolly, E., Braunstein, S., Formenti, S., and Schneider, R.J. (2006) Hypoxia inhibits protein synthesis through a 4E-BP1 and elongation factor 2 kinase pathway controlled by mTOR and uncoupled in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* **26**: 3955-3965.
- Cronan, J.E., Jr. (2002) Phospholipid modifications in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **5**: 202-205.
- de Groot, M.J., Bundock, P., Hooykaas, P.J., and Beijersbergen, A.G. (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechnol* **16**: 839-842.
- Espenshade, P.J. (2006) SREBPs: sterol-regulated transcription factors. *J Cell Sci* **119**: 973-976.
- Farmer, S.R., Robinson, G.S., Mbangkollo, D., Bond, J.F., Knight, G.B., Fenton, M.J., and Berkowitz, E.M. (1986) Differential expression of the beta-tubulin multigene family during rat brain development. *Ann N Y Acad Sci* **466**: 41-50.
- Ferguson, L.R., and von Borstel, R.C. (1992) Induction of the cytoplasmic 'petite' mutation by chemical and physical agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* **265**: 103-148.
- Fiehn, O., Kopka, J., Dormann, P., Altmann, T., Trethewey, R.N., and Willmitzer, L. (2000a) Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol* **18**: 1157-1161.
- Fiehn, O., Kopka, J., Trethewey, R.N., and Willmitzer, L. (2000b) Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental compositions using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry. *Anal Chem* **72**: 3573-3580.
- Fraenkel, D.G. (1992) Genetics and intermediary metabolism. *Annu Rev Genet* **26**: 159-177.
- Georg, R.C., and Gomes, S.L. (2007) Transcriptome analysis in response to heat shock and cadmium in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Eukaryot Cell* **6**: 1053-1062.
- Georg, R.C., Stefani, R.M., and Gomes, S.L. (2009) Environmental stresses inhibit splicing in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *BMC Microbiol* **9**: 231.
- Georg Rde, C., and Gomes, S.L. (2007) Comparative expression analysis of members of the Hsp70 family in the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *Gene* **386**: 24-34.
- Goodman, A., Goode, B.L., Matsudaira, P., and Fink, G.R. (2003) The *Saccharomyces cerevisiae* calponin/transgelin homolog Scp1 functions with fimbrin to regulate stability and organization of the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **14**: 2617-2629.
- Goodman, L.A., and Kruskal, W.H. (1954) Measures of association for cross classifications. *J Am Stat Assoc* **49**: 732-764.

- Gottschalk, W.K., and Sonneborn, D.R. (1982) Phenotypic dissections of the *Blastocladiella emersonii* zoospore's developmental choice. *Dev Biol* **93**: 165-180.
- Guzy, R.D., Mack, M.M., and Schumacker, P.T. (2007) Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and gene transcription in yeast. *Antioxid Redox Signal* **9**: 1317-1328.
- Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M., and Jain, R.K. (1997) Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* **3**: 177-182.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lucking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P.B., McLaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y.C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Koljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schussler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.J., and Zhang, N. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* **111**: 509-547.
- Higgins, C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**: 67-113.
- Hochachka, P.W., and Lutz, P.L. (2001) Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **130**: 435-459.
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J., and Schilperoort, R.A. (1983) A binary vector strategy based on separation of vir-region and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**: 179-180.
- Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S., and Hoekema, A. (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.* **2**: 208-218.
- Hooykaas, P.J.J., and Beijersbergen, A.G.M. (1994) The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annual Review of Phytopathology* **32**: 157-181.
- Huang, W.J., Xia, L.M., Zhu, F., Huang, B., Zhou, C., Zhu, H.F., Wang, B., Chen, B., Lei, P., and Shen, G.X. (2009) Transcriptional upregulation of HSP70-2 by HIF-1 in cancer cells in response to hypoxia. *Int J Cancer* **124**: 298-305.
- Hughes, A.L., Todd, B.L., and Espenshade, P.J. (2005) SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. *Cell* **120**: 831-842.
- Husson, A., Brasse-Lagnel, C., Fairand, A., Renouf, S., and Lavoinnie, A. (2003) Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle. *Eur J Biochem* **270**: 1887-1899.
- Ideker, T., Thorsson, V., Ranish, J.A., Christmas, R., Buhler, J., Eng, J.K., Bumgarner, R., Goodlett, D.R., Aebersold, R., and Hood, L. (2001) Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science* **292**: 929-934.
- Inderlied, C.B., and Sypherd, P.S. (1978) Glucose metabolism and dimorphism in *Mucor*. *J Bacteriol* **133**: 1282-1286.
- Jefferies, K.C., Cipriano, D.J., and Forgac, M. (2008) Function, structure and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *Arch Biochem Biophys* **476**: 33-42.

- Jiang, Y., Vasconcelles, M.J., Wretzel, S., Light, A., Martin, C.E., and Goldberg, M.A. (2001) MGA2 is involved in the low-oxygen response element-dependent hypoxic induction of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **21**: 6161-6169.
- Johnston, M. (1999) Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet* **15**: 29-33.
- Kandasamy, P., Vemula, M., Oh, C.S., Chellappa, R., and Martin, C.E. (2004) Regulation of unsaturated fatty acid biosynthesis in *Saccharomyces*: the endoplasmic reticulum membrane protein, Mga2p, a transcription activator of the OLE1 gene, regulates the stability of the OLE1 mRNA through exosome-mediated mechanisms. *J Biol Chem* **279**: 36586-36592.
- Klose, R.J., Kallin, E.M., and Zhang, Y. (2006) JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet* **7**: 715-727.
- Koide, T., Salem-Izacc, S.M., Gomes, S.L., and Vencio, R.Z. (2006) SpotWhatR: a user-friendly microarray data analysis system. *Genet Mol Res* **5**: 93-107.
- Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C., and Citovsky, V. (2001) Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1871-1876.
- Kwast, K.E., Burke, P.V., and Poyton, R.O. (1998) Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *J Exp Biol* **201**: 1177-1195.
- Kwast, K.E., Burke, P.V., Staahl, B.T., and Poyton, R.O. (1999) Oxygen sensing in yeast: evidence for the involvement of the respiratory chain in regulating the transcription of a subset of hypoxic genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5446-5451.
- Kwast, K.E., Lai, L.C., Menda, N., James, D.T., 3rd, Aref, S., and Burke, P.V. (2002) Genomic analyses of anaerobically induced genes in *Saccharomyces cerevisiae*: functional roles of Rox1 and other factors in mediating the anoxic response. *J Bacteriol* **184**: 250-265.
- Laabs, T.L., Markwardt, D.D., Slattery, M.G., Newcomb, L.L., Stillman, D.J., and Heideman, W. (2003) ACE2 is required for daughter cell-specific G1 delay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10275-10280.
- Lai, L.C., Kosorukoff, A.L., Burke, P.V., and Kwast, K.E. (2006) Metabolic-state-dependent remodeling of the transcriptome in response to anoxia and subsequent reoxygenation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **5**: 1468-1489.
- Liu, Y.V., and Semenza, G.L. (2007) RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 alpha degradation vs. stabilization. *Cell Cycle* **6**: 656-659.
- Lovett, J.S. (1975) Growth and differentiation of the water mold *Blastocladiella emersonii*: cytodifferentiation and the role of ribonucleic acid and protein synthesis. *Bacteriol Rev* **39**: 345-404.
- Lu, A., Ran, R., Parmentier-Batteur, S., Nee, A., and Sharp, F.R. (2002) Geldanamycin induces heat shock proteins in brain and protects against focal cerebral ischemia. *J Neurochem* **81**: 355-364.
- Maia, J.C., and Camargo, E.P. (1974) c-AMP phosphodiesterase activity during growth and differentiation in *Blastocladiella emersonii*. *Cell Differ* **3**: 147-155.
- Maia, J.C., Gomes, S.L., and Mennucci, L. (1979) Induction of germination in *Blastocladiella emersonii* by cyclic AMP and inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase. *Arch Biol Med Exp (Santiago)* **12**: 407-410.
- Marin-Hernandez, A., Gallardo-Perez, J.C., Ralph, S.J., Rodriguez-Enriquez, S., and Moreno-Sanchez, R. (2009) HIF-1alpha modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev Med Chem* **9**: 1084-1101.

- Markuszewski, M.J., Otsuka, K., Terabe, S., Matsuda, K., and Nishioka, T. (2003) Analysis of carboxylic acid metabolites from the tricarboxylic acid cycle in *Bacillus subtilis* cell extract by capillary electrophoresis using an indirect photometric detection method. *J Chromatogr A* **1010**: 113-121.
- Markuszewski, M.J., Szczykowska, M., Siluk, D., and Kaliszan, R. (2005) Human red blood cells targeted metabolome analysis of glycolysis cycle metabolites by capillary electrophoresis using an indirect photometric detection method. *J Pharm Biomed Anal* **39**: 636-642.
- Matthysse, A.G. (2007) The Genus *Agrobacterium*. In *The Prokaryotes: Proteobacteria: alpha and beta subclasses*. Vol. 5. Dworkin, M. and Falkow, S. (eds). New York: Springer New York, pp. 91-114.
- Mertens, E., Larondelle, Y., and Hers, H.G. (1990) Induction of Pyrophosphate:Fructose 6-Phosphate 1-Phosphotransferase by Anoxia in Rice Seedlings. *Plant Physiol* **93**: 584-587.
- Mertens, E. (1991) Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase, an anaerobic glycolytic enzyme? *FEBS Lett* **285**: 1-5.
- Michielse, C.B., Hooykaas, P.J., van den Hondel, C.A., and Ram, A.F. (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr Genet* **48**: 1-17.
- Nakagawa, Y., Ueda, A., Kaneko, Y., and Harashima, S. (2003) Merging of multiple signals regulating delta9 fatty acid desaturase gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* **269**: 370-380.
- Nissen, T.L., Schulze, U., Nielsen, J., and Villadsen, J. (1997) Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **143** (Pt 1): 203-218.
- Ntambi, J.M. (1999) Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res* **40**: 1549-1558.
- Papadopoulos, M.C., Sun, X.Y., Cao, J., Mivechi, N.F., and Giffard, R.G. (1996) Over-expression of HSP-70 protects astrocytes from combined oxygen-glucose deprivation. *Neuroreport* **7**: 429-432.
- Pasteur, L. (1861) Expériences et vues nouvelles sur la nature des fermentations. *Comp. Rend. Acad. Sci.* **52**: 1260-1264.
- Pfeiffer, T., Schuster, S., and Bonhoeffer, S. (2001) Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* **292**: 504-507.
- Plumier, J.C., Krueger, A.M., Currie, R.W., Kontoyiannis, D., Kollias, G., and Pagoulatos, G.N. (1997) Transgenic mice expressing the human inducible Hsp70 have hippocampal neurons resistant to ischemic injury. *Cell Stress Chaperones* **2**: 162-167.
- Pugliese, L., Georg, R.C., Fietto, L.G., and Gomes, S.L. (2008) Expression of genes encoding cytosolic and endoplasmic reticulum HSP90 proteins in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Gene* **411**: 59-68.
- Quackenbush, J. (2001) Computational analysis of microarray data. *Nat Rev Genet* **2**: 418-427.
- Raamsdonk, L.M., Teusink, B., Broadhurst, D., Zhang, N., Hayes, A., Walsh, M.C., Berden, J.A., Brindle, K.M., Kell, D.B., Rowland, J.J., Westerhoff, H.V., van Dam, K., and Oliver, S.G. (2001) A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat Biotechnol* **19**: 45-50.
- Rajdev, S., Hara, K., Kokubo, Y., Mestril, R., Dillmann, W., Weinstein, P.R., and Sharp, F.R. (2000) Mice overexpressing rat heat shock protein 70 are protected against cerebral infarction. *Ann Neurol* **47**: 782-791.

- Reeves, R.E., South, D.J., Blytt, H.J., and Warren, L.G. (1974) Pyrophosphate:D-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase. A new enzyme with the glycolytic function of 6-phosphofructokinase. *J Biol Chem* **249**: 7737-7741.
- Ribichich, K.F., Salem-Izacc, S.M., Georg, R.C., Vencio, R.Z., Navarro, L.D., and Gomes, S.L. (2005) Gene discovery and expression profile analysis through sequencing of expressed sequence tags from different developmental stages of the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *Eukaryot Cell* **4**: 455-464.
- Ribichich, K.F., Georg, R.C., and Gomes, S.L. (2006) Comparative EST analysis provides insights into the basal aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *BMC Genomics* **7**: 177.
- Salem-Izacc, S.M., Koide, T., Vencio, R.Z., and Gomes, S.L. (2009) Global gene expression analysis during germination in the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *Eukaryot Cell* **8**: 170-180.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, NY.
- Schild, L., Reinheckel, T., Reiser, M., Horn, T.F., Wolf, G., and Augustin, W. (2003) Nitric oxide produced in rat liver mitochondria causes oxidative stress and impairment of respiration after transient hypoxia. *FASEB J* **17**: 2194-2201.
- Semenza, G.L. (2007) Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE* **2007**: cm8.
- Setiadi, E.R., Doedt, T., Cottier, F., Noffz, C., and Ernst, J.F. (2006) Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. *J Mol Biol* **361**: 399-411.
- Soga, T., and Heiger, D.N. (2000) Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem* **72**: 1236-1241.
- Soga, T., Ueno, Y., Naraoka, H., Matsuda, K., Tomita, M., and Nishioka, T. (2002a) Pressure-assisted capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry for analysis of multivalent anions. *Anal Chem* **74**: 6224-6229.
- Soga, T., Ueno, Y., Naraoka, H., Ohashi, Y., Tomita, M., and Nishioka, T. (2002b) Simultaneous determination of anionic intermediates for *Bacillus subtilis* metabolic pathways by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem* **74**: 2233-2239.
- Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H., Tomita, M., and Nishioka, T. (2003) Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J Proteome Res* **2**: 488-494.
- Soll, D.R., and Sonneborn, D.R. (1972) Zoospore germination in *Blastocladiella emersonii*. IV. Ion control over cell differentiation. *J Cell Sci* **10**: 315-333.
- Spinnler, H.E., Ginies, C., Khan, J.A., and Vulfson, E.N. (1996) Analysis of metabolic pathways by the growth of cells in the presence of organic solvents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 3373-3376.
- Staben, C., Jensen, B., Singer, M., Pollock, J., Schechtman, M., Kinsey, J., and Selker, E. (1989) Use of a bacterial hygromycin B resistance gene as a dominant marker in *Neurospora crassa* transformation. *Fungal Genet. Newsl.* **36**: 79-81.
- Stecyk, J.A., Stenslokken, K.O., Farrell, A.P., and Nilsson, G.E. (2004) Maintained cardiac pumping in anoxic crucian carp. *Science* **306**: 77.
- Stewart, L.C., and Yaffe, M.P. (1991) A role for unsaturated fatty acids in mitochondrial movement and inheritance. *J Cell Biol* **115**: 1249-1257.
- Tanaka, Y., Higashi, T., Rakwal, R., Wakida, S., and Iwahashi, H. (2008) Development of a capillary electrophoresis-mass spectrometry method using polymer capillaries for metabolomic analysis of yeast. *Electrophoresis* **29**: 2016-2023.

- Taylor, C.T. (2008) Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. *Biochem J* **409**: 19-26.
- ter Linde, J.J., Liang, H., Davis, R.W., Steensma, H.Y., van Dijken, J.P., and Pronk, J.T. (1999) Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **181**: 7409-7413.
- Tikhonova, N.S., Moskaleva, O.S., Margulis, B.A., and Guzhova, I.V. (2008) [Molecular chaperone Hsp70 protects neuroblastoma SK-N-SH cells from hypoxic stress]. *Tsitologiya* **50**: 467-472.
- Todd, B.L., Stewart, E.V., Burg, J.S., Hughes, A.L., and Espenshade, P.J. (2006) Sterol regulatory element binding protein is a principal regulator of anaerobic gene expression in fission yeast. *Mol Cell Biol* **26**: 2817-2831.
- Valdez, L.B., Zauborny, T., Alvarez, S., Bustamante, J., Costa, L.E., and Boveris, A. (2004) Heart mitochondrial nitric oxide synthase. Effects of hypoxia and aging. *Mol Aspects Med* **25**: 49-59.
- van Engelen, F.A., Molthoff, J.W., Conner, A.J., Nap, J.P., Pereira, A., and Stiekema, W.J. (1995) pBINPLUS: an improved plant transformation vector based on pBIN19. *Transgenic Res* **4**: 288-290.
- Vasconcelles, M.J., Jiang, Y., McDaid, K., Gilooly, L., Wretzel, S., Porter, D.L., Martin, C.E., and Goldberg, M.A. (2001) Identification and characterization of a low oxygen response element involved in the hypoxic induction of a family of *Saccharomyces cerevisiae* genes. Implications for the conservation of oxygen sensing in eukaryotes. *J Biol Chem* **276**: 14374-14384.
- Vaulont, S., Vasseur-Cognet, M., and Kahn, A. (2000) Glucose regulation of gene transcription. *J Biol Chem* **275**: 31555-31558.
- Vencio, R.Z., and Koide, T. (2005) HTself: self-self based statistical test for low replication microarray studies. *DNA Res* **12**: 211-214.
- Vencio, R.Z., Koide, T., Gomes, S.L., and Pereira, C.A. (2006) BayGO: Bayesian analysis of ontology term enrichment in microarray data. *BMC Bioinformatics* **7**: 86.
- Vicencio, A., Bidmon, B., Ryu, J., Reidy, K., Thulin, G., Mann, A., Gaudio, K.M., Kashgarian, M., and Siegel, N.J. (2003) Developmental expression of HSP-72 and ischemic tolerance of the immature kidney. *Pediatr Nephrol* **18**: 85-91.
- Vieira, A.L., and Gomes, S.L. (2009) Global Gene Expression Analysis During Sporulation of the Aquatic Fungus *Blastocladiella emersonii*. *Eukaryot Cell (Submetido)*.
- Vieira, A.L., Linares, E., Augusto, O., and Gomes, S.L. (2009) Evidence of a Ca(2+)-(*)NO-cGMP signaling pathway controlling zoospore biogenesis in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Fungal Genet Biol* **46**: 575-584.
- Vogt, M., Puntschart, A., Geiser, J., Zuleger, C., Billeter, R., and Hoppeler, H. (2001) Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. *J Appl Physiol* **91**: 173-182.
- Webster, K.A. (2003) Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia. *J Exp Biol* **206**: 2911-2922.
- Winum, J.Y., Rami, M., Scozzafava, A., Montero, J.L., and Supuran, C. (2008) Carbonic anhydrase IX: a new druggable target for the design of antitumor agents. *Med Res Rev* **28**: 445-463.
- Wood, G.E., Khelef, N., Guiso, N., and Friedman, R.L. (1998) Identification of Btr-regulated genes using a titration assay. Search for a role for this transcriptional regulator in the growth and virulence of *Bordetella pertussis*. *Gene* **209**: 51-58.
- Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J., and Speed, T.P. (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* **30**: e15.

- Zhang, R., Zhou, L., Li, Q., Liu, J., Yao, W., and Wan, H. (2009) Up-Regulation of two actin-associated proteins prompts pulmonary artery smooth muscle cell migration under hypoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol* **41**: 467-475.
- Zhu, J., Oger, P.M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J., Farrand, S.K., and Winans, S.C. (2000) The bases of crown gall tumorigenesis. *J Bacteriol* **182**: 3885-3895.
- Zitomer, R.S., Carrico, P., and Deckert, J. (1997) Regulation of hypoxic gene expression in yeast. *Kidney Int* **51**: 507-513.
- Zupan, J., Muth, T.R., Draper, O., and Zambryski, P. (2000) The transfer of DNA from agrobacterium tumefaciens into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J* **23**: 11-28.
- Zwiers, L.H., and De Waard, M.A. (2001) Efficient Agrobacterium tumefaciens-mediated gene disruption in the phytopathogen Mycosphaerella graminicola. *Curr Genet* **39**: 388-393.

8 MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S 1: Lista completa dos genes diferencialmente expressos em hipóxia gradual e direta. Os valores representam a razão de expressão (teste/C70). As setas indicam os perfis de indução (para cima) ou repressão (para baixo).

Clone ID	SwissProt	Anotação	Perfil Geral	Hipóxia Direta				Hipóxia Gradual							
				C1_1h	C1_5h	C70r_1h	Kmeans HD	C70	C35	C17.5	C5	C1	C0	C70r	Kmeans HG
Metabolismo de Aminoácidos															
BeZSPN04C10	Q9P7L5	ornithine-oxo-acid transaminase, putative	↓	0.7	0.6	1.2	1								
BeE120N30H05	Q7RV8	Arginase	↓	0.5	0.9	1.1	1	1.1	1.1	0.8	0.6	0.4	0.4	1.1	1
BeE30N08H12	P9497	2-isopropylmalate synthase	↓	0.8	0.9	1.4	1	1.0	1.2	1.0	1.0	0.7	0.7	1.2	2
BeE30N15B02		cysteine synthase	↓	0.8	0.7	1.1	1		0.9	1.1	1.1		0.5	0.7	2
BeE30N19D09	Q7VVU3	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	↓	0.2	0.6	2.1	2	1.0	0.4	0.4	0.3	0.1	0.1	0.4	8
BeE60H28B12	Q96VZ6	Acetolactate synthase Ilv2	↓	0.4	0.5	2.9	1	1.0	1.2	1.5	1.3	0.3	0.3	1.5	1
BeE60N07B05	Q9NAE2	Probable urocanate hydratase	↓	0.6	0.8	0.9	1	1.1	1.1	1.0	0.9	0.6	0.8	0.9	2
BeE90D12G12	P48611	6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase	↓	1.0	0.7	1.4	1	1.0	1.1	0.9	0.8	0.6	1.3	0.6	5
BeG120N15B05	Q12642	S-adenosylmethionine synthetase (Fragment)	↓	0.3				1.0	0.5	0.5	0.5	0.1	0.2	0.6	8
BeZSPN16H02	P1869	Aspartokinase	↓	0.6	0.9	1.2	1	0.9	0.9	1.0	0.9	0.5	0.5	1.4	1
BeG30N04E01	Q8JHX9	Glutamate dehydrogenase 3	↓					1.2	0.8		0.5		0.6	0.8	2
BeZSPN14H05		histidinol phosphate aminotransferase	↓	0.7	1.0	1.4	1	1.0	0.7	0.7	0.7	0.3	0.2	0.7	1
BeE60C11F11	P22768	Argininosuccinate synthase	↑	0.9	1.6	1.1	3	1.0	1.8	1.2	1.2	1.6	1.7	0.4	6
BeG90N02C03	P78568	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	↑	1.7	2.1	1.2	3	1.1	1.1	0.9	1.0	1.7	2.1	1.0	6
BeG90N10B05	Q8KCK4	Glutamine synthetase	↑	1.2	1.7	1.3	3	1.0	1.1	0.9	1.2	1.3	1.9	1.0	6
BeZSPN09E10	O42615	Threonine dehydratase, mitochondrial precur		0.9		0.5									
BeE60C27C06	Q9C2U8	NAD+ dependent glutamate dehydrogenase		1.1	0.8	0.4	4		0.9	1.0	0.9	1.1	1.0	0.6	5
BeE90D18B03		NAD+ dependent glutamate dehydrogenase		1.3	0.8	0.4	4	1.0	0.9	0.7	0.8	1.1	1.3	0.5	5
BeG120N26D12	Q9Y8G5	NAD-specific glutamate dehydrogenase		1.4	0.8	0.5	4	1.0	1.0	0.8	0.9	1.0	1.4	0.6	5
BeE60N07C12	Q7ZWF5	Similar to glutamate oxaloacetate transaminase		1.1	1.2	1.5	3	1.0	1.1	1.3	1.1	0.8	0.7	0.8	2
BeG90N07G03		glutamate dehydrogenase, NAD(P)+		1.2		0.2			0.9	0.8	0.6	0.8	0.9	0.7	5
BeE60C15E06		glutamine synthetase		0.9		0.5									
BeG30N19E04	P87185	Cysteine desulfurase, mitochondrial precursor		0.9	0.9	1.4	1								
BeE60H21G01		homogentisate 1,2-dioxygenase						1.0	1.4	1.2	1.3	0.9	1.0	0.9	4
BeE60N06A04	Q7SD77	Phospho-2-keto-3-deoxyheptonate aldolase						1.1	1.1	1.1	1.2	0.8	0.9	1.5	4
BeG30N02C12	Q93HL2	Tyrosinase						0.9	1.4	1.1	1.2	1.5	1.2	1.3	4
BeG60N02D07		glycine cleavage system H protein (16.0 kD)						1.0	1.0	0.8	1.0	1.0	1.0	0.6	5
Ciclo Celular															
BeG30N12D04	Q2533	Cyclin-dependent kinases regulatory subunit	↓	0.7	0.9	1.1	1								
BeE120N32A08	P7862	Septin B	↑	1.0	1.8	1.2	3	0.9	1.4	1.0	1.1	1.1	1.4	0.8	6
BeE60N18D05		cyclin-dependent protein kinase PHOB	↑					1.1	1.1	0.9	1.1	1.4	1.6	1.1	6
BeG30N08C06	Q9C1M3	Septin	↑					1.0	1.1	1.0	0.9	1.2	1.7	1.0	6
BeZSPN15D07	P34991	S-phase kinase-associated protein 1A	↑					1.0	1.0	1.0	1.2	1.5	1.4	1.0	6
BeE60H26C08	Q9P3A7	Cell division cycle protein 48 homolog						1.0	0.9	0.9	1.1	0.9	1.0	0.7	5
Parede Celular															
BeE60N10E05	Q99447	Ethanolamine-phosphate cytidyltransferase	↓					1.0	1.1	0.8	0.9	0.6	0.6	0.9	2
BeG90N10G04	P87073	Chitin synthase 1	↓					1.2	0.8	0.8	0.5	0.6	0.6	0.7	2
BeE90N16E04	Q7X5L8	Chitinase Chi80 precursor	↑	1.3	1.5	1.0	3								
BeG90N06B05	Q96VN	Chitin deacetylase	↑	1.4		0.1									

BeZSPN18C06		proteophosphoglycan	↑	1.2	1.3	1.0	3										
BeE60N03F03		glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	↑	1.8	1.2	0.8	5	1.0	1.1	1.1	1.2	1.5	2.1	1.0		6	
BeZSPN18H03	Q9SQF7	Chitinase	↑	1.4	1.3	1.1	3	1.0	1.2	1.1	1.2	1.3	1.5	1.2		6	
Estrutura de Cromatina																	
BeG30N17G05	Q1469	programmed cell death 11	↓	0.9	0.7	0.9	4										
BeE120N03F12	Q9JM53	Programmed cell death protein 8, mitochondr	↓					1.0	0.9	0.8	0.8	0.7	0.7	0.8		2	
BeE30N02C10	Q9HDN1	Histone H3	↓					1.0	1.0	1.0	0.9	0.8	0.7	1.0		2	
BeE60H06B09	Q07135	Histone H2A	↓					1.0	1.0	1.1	0.9	0.8	0.6	1.1		2	
BeNSVP07G09	Q8J1K2	Histone H2B	↓					0.8	1.0	1.0	0.9	0.7	0.5	1.1		2	
Reparo de DNA																	
BeE30N07D04	O13768	Putative dna repair helicase	↑	2.0	1.6	1.0	5										
Replicação de DNA																	
BeE60H16G11		Origin recognition complex, subunit 5 (ISS)	↑	4.3	3.0	0.5	6	0.9	0.9	0.9	1.0	3.9	12.6	0.8		3	
BeG120N03B10	Q8R323	Replication factor C subunit 3	↑	3.5	2.0	1.0	6				1.1	2.2	6.5			3	
Metabolismo Energético																	
BeE90N17C02-1	Q83PF	deoxyribose-phosphate aldolase [Escherichia coli]	↓	0.6		0.7											
BeG120N19C09		6-phosphogluconolactonase [Laccaria bicolor	↓	0.5		0.9											
BeNSVP12G02		phosphoenolpyruvate carboxykinase [Emericella nidu	↓	0.7	0.9	1.0	1										
BeZSPN09E08	Q7Z8B6	H(+)-ATPase [Glomus mosseae]	↓	1.0	0.6	0.6	4										
BeE120N27B02	P5625	Cytochrome c	↓	0.6	0.7	1.0	1	1.0	0.9	0.9	0.9	0.5	0.3	1.4		1	
BeE30N04B04	Q9UVH9	Fox2 protein	↓	0.4	0.6	1.8	1	1.0	0.9	1.1	1.4	0.6	0.6	2.2		2	
BeE60H29B11		ATP synthase epsilon chain domain containing protein	↓	0.7	0.8	1.2	1	0.9	1.0	1.0	0.9	0.7	0.6	0.8		2	
BeG30N08D01	Q9Y3D8	Adenylate kinase isoenzyme 6	↓	0.9	0.6	0.9	4	1.0	1.0	1.0	0.9	0.6	0.6	1.1		2	
BeE120N27B03	Q03015	NADH-ubiquinone oxidoreductase 12 kDa subunit	↓					1.1	0.8	0.9	0.9	0.8	0.7	1.0		2	
BeE30N04H06	Q9Z2K9	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	↓					1.1	1.3	1.2	1.1	0.6	0.8	1.0		2	
BeE30N05E04	Q7Z940	Succinyl-CoA synthetase, beta subunit	↓					1.1	1.1	0.9	0.8	0.7	0.7	1.0		2	
BeE60N08H02	O13350	ATP synthase D chain, mitochondrial	↓					1.0	1.1	1.0	1.0	0.7	0.8	0.9		2	
BeG120N03B06	Q9UWE0	Dihydrolipoamide succinyltransferase	↓					1.0	0.9	0.8	0.7	0.4	0.5	0.7		1	
BeG120N07H08	O74699	Aconitase	↓					1.0	0.9	0.8	0.9	1.0	0.8	1.4		2	
BeG90N01G09	Q7NJZ3	Ribose 5-phosphate epimerase	↓					0.8	0.7	0.8	0.8	0.6	0.4	0.8		2	
BeG90N12C05		glutaryl-Coenzyme A dehydrogenase isoform a	↓					1.0	1.0	0.9	0.7	0.6	0.4	0.9		2	
BeE60H08E04	Q9A212	Quinone oxidoreductase	↑	1.2	1.5	1.0	3										
BeE60H17D05	P53659	Vacuolar ATP synthase subunit d	↑	1.5	1.4	1.0	3										
BeE60H32F11		aldose 1-epimerase, putative [Aspergillus clavatus	↑	1.7	1.2	0.9	5										
BeE60N02F01		UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	↑	1.5	1.9	1.0	3										
BeE60N17G05	Q9YHT2	succinate dehydrogenase complex, subunit B	↑	2.1	1.6	0.9	5										
BeE90N05B09	Q8GUB3	Putative vacuolar ATPase subunit H	↑	1.6	1.4	1.2	3										
BeG30N12E07	Q9P8D2	Cytochrome c oxidase subunit V	↑	1.4	1.2	0.9	5										
BeG60N14B08	Q86AV6	citrate synthase [Dictyostelium discoideum	↑		1.7	1.1											
BeG90N01D12	P4157	6-phosphogluconate dehydrogenase	↑	1.0	2.2	1.1	3										
BeG90N05E08	Q9171	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta su	↑	1.2	1.4	1.0	3										
BeE120N03E01	Q8ZN3	D-lactate dehydrogenase	↑	5.0	4.0	0.6	6	1.0	1.0	0.5	1.2	4.8	4.2	0.4		3	
BeE30N02H06	Q9P4V2	Phosphoacetylglucosamine mutase	↑	2.3	1.6	0.9	5		1.1	0.9	1.3	2.0	2.2	0.9		6	
BeE30N15D01		NADP-dependent alcohol dehydrogenase	↑	1.6	2.9	1.4	3	1.0	1.0	1.3	1.3	2.5	3.7	1.2		7	
BeE30N21H07	P6738	Glycogen phosphorylase	↑	1.3	2.0	1.0	3	1.1	1.1	0.9	1.2	1.4	1.7	0.7		6	
BeE60H08B07	O74478	phosphoglucomutase	↑	1.5	1.4	1.0	3	1.0	1.3	0.9	1.1	1.2	1.6	1.1		6	
BeE60N02G08		aldose 1-epimerase, putative	↑	3.1	1.8	0.8	6	1.1	1.2	1.2	1.3	2.4	2.4	0.7		6	
BeE60N05D05	Q8EBH2	Transaldolase	↑	1.5	1.5	1.0	3	1.1	1.0	1.0	1.2	1.6	3.1	0.8		6	
BeE60N10B03		vacuolar ATP synthase subunit c''	↑	2.1	1.3	0.9	5	0.9	1.2	1.1	1.4	2.3	2.2	0.8		6	
BeE90N15E12		glycogen phosphorylase	↑	1.5		1.2		1.1	1.0	0.9	1.2	1.7	2.1	0.8		6	
BeG120N01F06	O57656	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+]	↑	1.2	1.5	0.9	3	1.1	1.1	1.0	0.9	1.2	1.7	0.8		6	
BeG30N15D05	Q8Y2Q8	carbonic anhydrase protein	↑	5.5	2.8	0.5	6		1.8	1.1	3.9	5.4	3.4	0.3		7	
BeG90N11A02	Q9WD9	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	↑	1.9	2.4	1.2	3	1.0	1.4	1.3	2.0	2.3	2.6	0.9		7	
BeG90N18E08	Q8X97	Probable ATP-citrate synthase subunit 1	↑	1.7	1.1	0.4	5	1.0	1.3	1.1	1.2	1.3	2.0	0.4		6	
BeE120N26G05	P31413	Vacuolar ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit	↑					1.0	1.1	1.1	1.3	1.5	1.4	1.0		6	
BeG120N06H01		similar to phosphoglucomutase 2	↑					1.0	1.3	0.9	1.1	1.3	1.6	1.1		6	
BeG90N03E03	P42894	Enolase	↑					1.0	1.2	1.1	1.4	1.6	1.9	0.7		6	
BeG90N13C04		phosphoglucose isomerase	↑						1.1	1.2		1.3	1.3			6	

BeE60N04H10	Q9Y6M9	NADH-ubiquinone oxidoreductase B22 subunit		1.2	1.4														
BeE60C10H10		Mandelate racemase/muconate lactonizing enzyme-like								1.0	1.5				2.5				4
BeE60N09D01		acyl-coenzyme A oxidase I, putative								1.3	1.1	1.4	1.3	1.3	1.8				4
Metabolismo de Lipídeos																			
BeE60C35H09	Q8BH95	Enoyl coenzyme A hydratase	↓	0.8	0.6	0.6	4												
BeG90N21B12		Enoyl-CoA hydratase (31.2 kD) [Caenorhabditis eleg	↓	0.9	0.5	0.6	4												
BeE30N02B11		fatty acid-2 hydroxylase [Laccaria bicolor	↑	2.2	1.1	0.9	5												
BeE60C25C06	Q88LT3	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	↑		1.1	0.3													
BeE60N03A03		C-5 sterol desaturase	↑	1.7															
BeG90N07B07		leukotriene A4 hydrolase	↑	1.6	1.1	0.7	5												
BeE120N30F01	P5345	C-4 methyl sterol oxidase	↑	1.6	1.2	0.8	5	1.1	1.0	1.1	1.3	1.5	1.4	0.9					6
BeE60H26A05	Q872A4	Related to phosphatidylserine decarboxylase	↑	5.0	2.6	1.0	6	0.9	1.8	2.5	6.1	15.8	12.6	2.7					7
BeG120N16E05	P4398	Fatty acid synthase subunit alpha	↑	1.5	1.7	0.4	5	1.0	1.3	1.1	1.1	1.8	2.0	0.5					6
BeG60N06G05	P7978	Delta-9 fatty acid desaturase	↑	3.1	1.9	0.3	6	1.0	1.9	0.7	1.4	3.8	4.4	0.2					3
BeE60C08F07		Deoxyhypusine hydroxylase (Deoxyhypusine monooxygenase)	↑					0.9		1.0	1.1	1.1	1.4	1.2					6
BeE60N03G10		cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	↑					1.1	1.8	1.5	3.8	8.9	5.7	2.0					7
BeZSPN13B04		1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase (AtaAp)	↑					0.9	0.8	1.1	1.0	1.2	1.5	0.9					6
BeE30N04A05		delta 4-(E)-sphingolipid desaturase	↑					1.1	1.0	0.8	0.8	1.1	1.9	0.5					5
BeE90D17G07	Q9P4D7	Long chain polyunsaturated fatty acid elongation enzyme		0.6	1.0	0.8	1	1.0	1.0	1.1	1.4	1.2	1.3	0.6					6
BeG90N16H08	Q7ZA40	Serine palmitoyl transferase subunit						0.9	1.3	1.2	1.4	1.2	1.5	1.2					4
BeZSPN02F03	P33121	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 2						0.9	1.0	1.0	1.0	0.7	0.9	0.9					5
Metabolismo de Ácidos Nucleicos																			
BeE30N17G08	Q7ZV49	hypoxanthine phosphoribosyltransferase I	↓	1.0	0.5	1.5	1												
BeE30N18D07		ATP phosphoribosyltransferase	↓	0.7	0.9	1.1	1												
BeG60N16H02	Q9BLT3	Nucleoside hydrolase	↓	0.6	0.5	0.9	1												
BeG90N09B12	Q27124	ribonucleotide reductase small subunit	↓	0.7	0.7	1.0	1												
BeG90N12C08		similar to Endonuclease G like 1 (Endo G like)	↓	0.5															
BeG30N12D07	O93937	PyrABCN	↓	0.7	1.2	2.0	1	1.0	0.7	0.4	0.7	0.6	0.8	0.9					2
BeG30N15B12		URA1 protein	↓	0.9	1.5	1.9	3	1.0	0.8	0.7	0.8	0.7	0.9	1.0					2
BeG30N20G08	Q8NIH8	Nuclease Le3	↓	1.1	0.6	0.7	4	1.1	0.9	1.0	0.6	0.9	0.6	0.5					5
BeG60N19B01	P38625	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	↓	0.4	1.1	1.5	1	1.1	0.7	0.8	0.7	0.7	0.6	1.0					2
BeE60C24G08	Q8XRK0	TDP-glucose-4,6-dehydratase-related protein	↓					1.0	0.8	0.8	0.7	0.7	0.8	0.8					2
BeG120N09C02	Q8NIH8	Nuclease Le3	↓					1.2	1.3	1.0	0.9	0.6	0.7	1.0					2
BeG90N18B04		Adsl-prov protein	↓					1.0	0.7		0.5		0.6	0.8					2
BeG60N01B06	Q84P58	Adenosine kinase-like protein	↓					1.0	0.8	0.6	0.7	0.4	0.5	0.7					2
BeZSPN03F10		probable inosine-5\'-monophosphate dehydrogenase	↑	1.1	1.5	1.4	3												
BeE30N01E09		putative purine nucleoside phosphorylase	↑	3.7	1.4	0.6	6	1.1	1.1	0.7	1.0	2.0	4.7	0.6					3
BeE30N07A05		Nucleoside phosphorylase	↑	4.7	2.3	0.7	6	1.1	1.2	0.7	1.1	4.3	4.6	0.6					3
BeE90D15C05	O94413	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	↑	1.9	1.7	1.3	3	1.1	0.9	0.9	0.9	1.4	1.7	0.9					6
BeG90N19E11	Q871N5	Probable uracil phosphoribosyltransferase F	↑	2.2	1.1	0.8	5	1.0	0.9	0.7	0.8	1.0	1.2	0.7					5
BeNSVP04F11		similar to cytidine deaminase	↑	2.3	0.7	0.4	5	0.9	1.2		1.3	2.6		1.0					6
BeE120N25C08	P20054	Protein PYR1-3	↑					1.1	1.1	1.1	1.0	2.2	1.3	0.7					6
BeE60C10B01	Q8D6V0	Predicted nucleotidyltransferase	↑							1.1	0.9	1.4	2.3	1.5	1.3				6
BeE90D18C05	O42806	Cpa protein (Fragment)	↑					1.0	1.0	0.9	0.9	2.2	1.5	0.5					6
BeG90N06E08	Q2787	Adenylosuccinate synthetase		1.0	1.2	1.5	3												
BeG30N09D02		5\'-3\' exoribonuclease 2; Dhml-like protein				0.3													
BeG60N02F10	Q9VC99	Probable uridine-cytidine kinase		1.0		0.4													
BeG30N13A10	Q9KVD5	Orotate phosphoribosyltransferase								0.8			0.5		0.6				5
BeG90N15D01	P21588	5'-nucleotidase precursor						1.1	0.8	0.8	0.7	0.7	0.8	0.7					5
Enovelamento e Modificação de Proteínas																			
BeE120N06H09	O13351	Ubiquitin-like protein smt3/pmt3	↓	0.5	0.7	1.2	1												
BeE120N20H04		putative protein serine/threonine kinase	↓	0.9	0.7	0.8	4												
BeE30N09G01	Q9M4C4	prefoldin subunit 4 VIP3 protein	↓	0.6	0.8	1.1	1												
BeE30N16B09	O77622	T-complex protein 1, zeta subunit	↓	0.7	0.9	0.9	1												
BeE30N22H03	Q9UTS	Hypothetical subtilase-type proteinase psp3	↓	0.6	0.9	1.2	1												
BeE60H10E07		T-complex protein 1, theta subunit	↓	0.5	0.8	0.8	1												
BeE60H22A09	Q13526	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	↓	0.4	1.0	0.9	1												

BeE60H30E02	O6953	20S proteasome subunit	↓	0.5	0.9	0.7	1										
BeE60H32E04	O42993	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	↓	0.6	0.7	0.8	1										
BeE60N11B08	Q9M77	Putative serine/threonine protein kinase	↓	0.6	0.7	0.9	1										
BeE90D20D04	P5999	T-complex protein 1, delta subunit	↓	0.7	0.9	0.9	1										
BeG90N21H11		aminopeptidase-like 1 [<i>Xenopus laevis</i>]	↓	0.6	0.8	1.0	1										
BeE60C24C07	Q7ZA53	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	↓	0.6	0.7	0.9	1	0.9	1.0	1.0	1.2	0.9	0.7	0.9		2	
BeE60N07C06	Q9UTM4	T-complex protein 1, epsilon subunit	↓	0.5				1.0	1.1	1.0	1.1	0.6	0.6	0.9		2	
BeE60N07G09	Q872U9	Probable chaperonin of the TCP1 ring comple	↓	0.7	0.8	0.8	1	1.0	0.9	0.9	1.0	0.6	0.7	0.7		2	
BeE60N16F09	Q95V46	Chaperonin subunit 1	↓	0.6	0.9	1.0	1	1.1	1.0	0.9	1.0	0.6	0.7	0.8		2	
BeG120N23B05	Q99832	T-complex protein 1, eta subunit	↓	0.6	0.8	0.9	1	1.0	1.0	0.9	0.9	0.7	0.7	0.8		2	
BeE60H30F05		similar to Chaperonin containing TCP1, subunit 4 (delta)	↓					1.0	0.9	0.9	0.8	0.7	0.7	0.8		2	
BeE60N15H02	P24155	Thimet oligopeptidase	↓					1.1	0.9	1.0	0.8	0.7	0.6	0.9		2	
BeG120N17H03	P46595	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 4	↓					1.0	1.1	1.1	1.1	0.9	0.7	0.8		2	
BeG90N16A03	Q9VSF3	NEDD8 conjugating enzyme Ubc12	↓					0.9	1.0	1.0	1.1	0.9	0.6	0.9		2	
BeG90N22B10	Q7Q8R2	AgCP11849 (Fragment)	↓					1.0	0.9	0.9	0.8	0.8	0.6	1.1		2	
BeE60H29G11	Q9P6I2	Glutamate carboxypeptidase-like protein	↑	1.5	1.1	1.2	3	1.0	1.2	1.0	1.5	1.6	1.6	1.4		4	
BeE60N15G05		DnaJ-like protein MsJ1 - alfalfa	↑	1.6	1.2	1.0	5	1.1	1.1	1.3	1.4	2.4	2.7	0.8		7	
BeE60H15E02		DnaJ-class chaperone regulator [C. neoformans]	↑	1.4	1.0	0.8	5										
BeE60N18G04	O6178	protein N-terminal asparagine amidohydrolase	↑	1.7	1.4	1.2	3										
BeE90D03E05	Q9NTU3	Ubiquitin-activating enzyme 3	↑	1.6	1.5	1.0	3										
BeG60N12E03	O43447	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H	↑	1.5	1.1	0.9	5										
BeE90D05G05	Q7Z8F2	Putative serine/threonine phosphatase 2C ptc2	↑	2.3	1.9	0.9	5	1.0	1.3	1.5	2.2	4.9	4.8	0.9		7	
BeG120N03B03		CasA	↑	2.2	1.2	0.8	5	1.0	1.2	1.1	1.4	2.3	3.7	0.9		7	
BeE60H17C06	P52495	Ubiquitin-activating enzyme E1 1 (Fragment)	↑					1.0	1.1	1.1	1.4	1.1	1.1	0.7		6	
BeE60H22F09	O74819	POLYUBIQUITIN	↑					0.9	1.2	1.2	1.4	1.3	1.5	1.2		6	
Homeostase Redox																	
BeE60C19G01	Q4IHX8	Thioredoxin peroxidase	↓	0.6	1.1	1.0	1										
BeE60H29E07	Q1137	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	↓	0.6	0.8	0.9	1										
BeE90N13F05	Q9NL96	Glutathione reductase	↓	0.2	1.3	0.9	2										
BeG120N18H03	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 2	↓	0.6	1.1	0.9	1										
BeG30N04A03	O1427	pyridoxine biosynthesis protein	↓	0.5													
BeE30N14F04	Q3M328	Putative glutathione S-transferase-like 6	↑	1.8	1.2	1.0	5										
BeE90D14B09		thioredoxin domain protein, DsbA family	↑	1.0	1.7	1.5	3										
BeE90D11E10	Q16961	Disulfide-like protein	↑	1.4	1.2	1.0	5	1.0	1.0	0.9	1.1	1.3	2.3	1.1		6	
BeE30N18H03		Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase-related, FMN-binding protein	↑					1.1	1.2	0.9	1.1	1.2	1.4	1.0		6	
BeE60N14F11	Q9BG13	Peroxioredoxin 2	↑					0.7	1.1	1.2	1.3	1.3	1.3	1.1		6	
BeE90D18F01	P40581	Glutathione peroxidase 3	↑					0.9	1.1	1.3	1.4	1.2	1.5	1.2		6	
Proteínas Ribossômicas / Tradução																	
BeE120N37D12	P38665	60S ribosomal protein L24	↓	1.0	0.6	1.0	4									6	
BeE60H23E04	O42952	40S ribosomal protein	↓	0.6	0.7	1.0	1										
BeE60N19C01	O74966	Probable small nuclear ribonucleoprotein G	↓	0.9	0.6	1.0	4										
BeE90D08E09	Q9XGL4	60S ribosomal protein L31	↓	0.7	1.0	0.9	1										
BeG120N01H09		structural constituent of ribosome [C. neoformans]	↓	0.6	0.8	1.0	1										
BeG120N10H02	Q95V37	ribosomal protein L29 [<i>Bombyx mori</i>]	↓	0.6	0.9												
BeG90N04A04		Probable eukaryotic translation initiation factor	↓	0.6	0.7	1.1	1										
BeG90N09C08		Elongation factor G 1, mitochondrial precursor (mE	↓		0.3	1.3											
BeG90N15C05	Q9S826	Putative U3 small nucleolar ribonucleoprotein	↓	1.0	0.7	1.0	4										
BeE30N15A04	P7983	Eukaryotic translation initiation factor 3	↓	0.7	0.7	1.0	1	1.0	0.9	0.8	0.8	0.5	0.6	1.0			
BeG120N20E02	Q9NPE3	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3	↓	0.4	0.4	0.9	2	0.9	0.9	1.1	0.9	0.3	0.3	1.3		2	
BeG60N15D01	O7469	SNU13 snRNP subunit homolog	↓	0.6	0.5	0.9	1	1.0	0.9	0.9	0.8	0.4	0.2	1.2		1	
BeG90N02G11		phenylalanine-tRNA ligase	↓	0.9	0.5				0.9	1.0	0.9	0.4	0.9	1.0		1	
BeG90N10A10	P32495	High mobility group	↓		0.5	0.9		1.0	1.0	0.9	0.9	0.5	0.4	1.2		2	
BeG120N22D07	Q556	Arginyl tRNA synthetase, cytoplasmic	↓	0.7	0.6	1.2	1	1.0	1.1	1.3	1.0	0.5	0.5	1.7		1	
BeNSVP10C04		eIF3/signalosome protein	↓	0.6				0.9	0.9	1.0	0.7	0.5	0.5	1.3		1	
BeE30N13H12		lysyl-tRNA synthetase	↓					1.0	1.0	0.9	0.8	0.6	0.6	1.0		2	
BeE30N18E04		glycyl-tRNA synthetase	↓					1.0	0.9	0.8	0.8	0.7	0.8	0.9		2	
BeE30N22E01	O14339	60S ribosomal protein L17-A	↓					0.9	0.9	0.8	0.8	0.7	0.7	0.8		2	

BeE60H15C05	P87144	Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	↓					1.0	1.0	1.2	1.0	0.6	0.7	1.1	2
BeG120N04E02		Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 1A	↓					0.9	0.9	0.9	0.8	0.7	0.6	1.0	2
BeG120N11F05		similar to Eukaryotic translation initiation factor	↓					0.9	1.1	0.9	0.9	0.6	0.6	1.1	2
BeG120N13E04	Q9HGT6	Seryl-tRNA synthetase, cytoplasmic	↓					1.1	1.0	1.0	0.9	0.8	0.7	1.1	2
BeG30N06D06		IF5_YEAST Eukaryotic translation initiation factor 5	↓					1.0	1.2	0.9	0.9	0.6	0.7	1.1	2
BeG30N13C06	O14044	Ribosomal RNA processing protein 28	↓					0.9	1.1		0.9		0.6	1.0	2
BeZSPN06C04	Q09692	tryptophanyl-tRNA synthetase	↓					1.1	1.0	1.2	1.1	0.6	0.9	1.6	2
BeZSPN17H02		similar to Fibrillarin CG9888PA	↓					1.0	1.0	0.9	0.9	0.5	0.4	1.1	2
BeE60N04D02	Q9CHN6	Elongation factor P	↑	1.1	1.4	1.3	3								1
BeG30N13H07	Q13685	ribosome biogenesis protein Sgt1	↑	1.2		0.4									
BeG90N19F12	P29691	Elongation factor 2	↑	1.2	1.6	0.5	5								
BeG90N07C02	Q84KQ4	Elongation factor-1alpha (Fragment)	↑					1.0	1.1	1.0	1.1	1.5	1.6	0.9	
BeNSVP07H09	Q84KQ4	Elongation factor-1alpha (Fragment)	↑						1.1	1.3	1.1	1.4	1.4		6
BeZSPN08B03		50S ribosomal protein L2		1.0	0.4	0.4	4	1.0	0.8	1.0	0.9	1.1	1.4	0.9	6
BeG120N08G05	Q9P72	60S ribosomal protein L16		0.9	1.1	1.3	3								
BeG120N26G03		elongation factor EF-Tu		1.0		0.5									
BeG30N02C06	O74862	tRNA synthetase				0.4									
BeG90N08H03		50S ribosomal protein L3				0.2									
BeG30N14A04		eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7						0.9	1.5	1.0	1.2	0.9	0.9	1.2	4
Transdução de Sinal															
BeE120N02E04	Q7YXG1	soluble guanylyl cyclase 2 beta	↓	1.0	0.5	0.6	4								
BeE60N16D02	P3446	Guanine nucleotide-binding protein alpha-8	↓	0.4	0.8	0.8	2								
BeG90N08A02	Q9W711	activated protein kinase C receptor	↑	0.9	1.4	1.1	3								
BeZSPN16D09	Q12741	cAMP-dependent protein kinase catalytic sub	↑	1.2	1.4	1.3	3								
BeE120N28E07	Q9HFN1	G protein alpha subunit (Fragment)		0.8	0.9	0.7	4								
Resposta a Estresse															
BeZSPN11F03		10 kDa heat shock protein, mitochondrial	↓	0.5	0.6	0.9	1	1.0	0.9	0.8	0.8	0.4	0.4	0.8	1
BeG60N07C03	Q9S9N1	Hsp70-3 (<i>Blastocladiella emersonii</i>)	↓					1.1	1.0	0.8	0.8	0.6	0.7	1.0	2
BeE60H20C05	P22774	Hsp70-9 (<i>Blastocladiella emersonii</i>)	↑	5.9	2.2	0.5	6	1.0	0.9	0.6	1.2	4.0	4.4	0.5	3
BeE60H29E01		putative stress-related protein	↑	2.2	1.5	0.7	5	1.0	1.1	0.8	1.2	1.6	2.2	0.9	6
BeE60H06A02	P4872	Hsp70-1 (<i>Blastocladiella emersonii</i>)		0.9	0.8	0.5	4	1.1	1.1	0.8	0.8	1.0	1.1	0.5	5
BeE60C13A12	Q8DM43	Heat shock protein		1.1	1.0	0.5	4								
Estrutura Celular / Microtúbulos															
BeE120N07A12		roadblock-related dynein light chain	↓	0.6	0.7	1.1	1								
BeE60N12E01	Q9196	Myosin regulatory light chain cdc4	↓	0.7											
BeE90N17C06	Q9SMH3	Dynein 1-alpha heavy chain	↓	0.4	0.9	0.9	1								
BeE60H23E05		calponin/transgelin	↑	1.5	1.0	0.7	5								
BeG30N07C04	P25323	Myosin light chain kinase	↑	1.6		0.3									
BeE60N03E07		beta-tubulin	↑	1.4	1.5	1.0	3	1.1	1.2	1.0	1.2	1.4	1.8	0.9	6
BeE60N12G09	P7436	Tubulin beta-1 chain	↑	1.4	1.3	1.1	3	1.2	1.0	1.0	1.2	1.2	1.7	0.9	6
BeE60H28B01	P10989	Actin	↑					1.0	1.2	1.2	1.2	1.3	1.6	0.9	6
BeE60N13F03		beta-tubulin	↑					1.0	1.1	1.0	1.3	1.4	1.5	0.9	6
BeE90D08H04	Q9UFH2	Axonemal beta dynein heavy chain 17	↑						0.9	0.9	1.0	2.2	1.2	1.4	6
Transcrição / Processamento de RNA															
BeE90D17A08	Q7ZY47	ATP-dependent RNA helicase DDX42	↓	0.3	1.0	0.8	2								
BeZSPN12F04	Q3532	Probable ATP-dependent RNA helicase HAS1	↓	0.9	0.7	1.0	4								
BeG120N02A10	Q9916	Putative ATP dependent RNA helicase C1F7.02	↓	0.6	0.6	0.9	1	1.0	1.0	0.9	0.9	0.4		1.1	1
BeE30N22H05	O8198	RNA polymerase I, II and III 24.3 kDa subun	↓	0.2	0.7	1.0	2								
BeE90D16F01	Q9P6Q6	mRNA-capping enzyme subunit beta	↓		0.5										
BeG90N17F03	Q9NQT4	exosome component Rrp46 [Homo sapiens]	↓	1.2	0.5	0.5	4								
BeZSPN17G09	Q8BU5	DNA-directed RNA polymerases III 12.5 kDa	↓	0.8	0.6	0.9	4								
BeE30N15E05	P2441	Ras-related protein Rab-11A	↓	0.5	0.6	1.2	1	1.0	1.0	1.0	0.9	0.7	0.6	1.2	2
BeG90N10B01		DNA-directed RNA polymerase I subunit D protein	↓	0.6	0.6	1.0	1	0.9	1.0	0.9	0.9	0.5	0.5	1.3	2
BeE60N18A09	Q9UVL1	Nonhistone protein 6	↓					0.9	1.0	1.0	1.0	0.8	0.6	0.7	2
BeG60N07D01	Q8MYR3	La related protein	↓					1.0	1.0	0.8	0.7	0.6	0.6	1.2	2
BeE90D08E03		RNA polymerase II elongator-associated protein	↑	2.1	1.7	0.9	5	1.0	1.2	1.5	2.0	3.9	4.5	0.9	7
BeG90N19A06		putative reverse transcriptase RNaseH-integrase				0.3									
BeE60N11E05	O94666	DNA-directed RNA polymerase III largest sub						1.0	1.4	1.2	1.5	1.2	1.2	1.5	4

BeG60N15E01	Q00659	Sulfur metabolite repression control protein						1.0	1.2	1.0	1.2	1.1	1.1	1.4	4
Transporte															
BeE120N01A01	Q87C4	Cationic amino acid transporter	↓	0.5	0.8	0.8	1								
BeE120N35H01	Q7SAQ1	Clathrin assembly protein 2 small chain	↓	0.6	0.6	0.7	1								
BeE60H21G09	Q8RBT1	Amino acid transporters	↓	1.0	0.7	0.8	4								
BeE90D19D08	Q8T665	ABC transporter AbcH.1	↓	0.6	1.0	0.9	1								
BeG120N07E03	Q9P8H	nuclear transport factor 2 (ntf-2), putative	↓	0.6	0.8	1.1	1								
BeG90N14C01		high affinity methionine permease [Aspergillus clavatus	↓		0.2										
BeE30N06H12		Peptide transporter PepT1	↓	0.7	0.7	1.0	1	1.0	0.9	0.9	0.8	0.6	0.7	0.9	2
BeE30N10D02	Q6593	Oligopeptide transporter 2	↓	0.4	0.1	1.0	8	1.1	1.0	1.2	1.1	0.5	0.5	0.7	1
BeE30N17A03	P4897	High affinity transporter for glutathione	↓	0.3	0.5	0.8	2	1.0	1.0	1.1	1.1	0.4	0.4	0.8	1
BeE60N10A01	P38264	Inorganic phosphate transporter PHO88	↓	0.4	0.7	1.4	1	0.9	0.8	0.7	0.7	0.3	0.3	0.8	1
BeE60N13C09	P7144	Outer mitochondrial membrane protein porin	↓	0.7	0.8	0.9	1	1.0	0.9	0.7	0.9	0.5	0.5	0.8	2
BeG60N20F09	Q87216	Probable iron inhibited ABC transporter 2	↓	0.7	0.7	1.0	1	1.0	1.0	1.1	1.0	0.7	0.7	1.4	2
BeG90N09B05		proton-glutamate symporter	↓	0.5				1.1	0.9	0.8	0.5	0.4	0.4	0.7	2
BeE120N04F11		putative mitochondrial carrier protein	↓					1.0	0.8	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	2
BeE60H30F10	Q10481	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit tim13	↓					1.1	0.9	1.0	0.9	0.8	0.7	1.1	2
BeE60N18A11		putative phosphate/phosphoenolpyruvate translocator	↓					1.0	1.0	0.9	1.0	0.8	0.6	0.8	2
BeG120N24A07	Q8H727	ADP/ATP translocase	↓						1.2	1.0	0.7	0.6	0.7	0.8	2
BeG30N12H02		probable amino acid transporter	↓					1.0	1.1	1.1	1.2	0.8	0.7	1.0	2
BeG30N19C05	Q63424	Oligopeptide transporter, kidney isoform	↓						0.8	0.7	0.6	0.8	0.5	1.0	2
BeG90N09D08	O74700	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM9	↓					0.9	0.8	0.8	0.6	0.6	0.4	1.0	1
BeG90N16G06	Q9UUY0	calcium P-type ATPase	↓					1.0	1.0	1.0	0.9	0.7	0.6	0.9	2
BeZSPN05F06		hypothetical protein [Neurospora crassa]	↓					1.0	1.0	1.0	0.9	0.7	0.8	1.5	2
BeE90N13G10	P21851	dapter-related protein complex 2 beta 1 subunit	↑	1.3	1.5	1.0	3								
BeG120N07C03	Q84VI6	Phosphate transporter HvPT7	↑	1.2	1.3	1.3	3								
BeG60N01F09		methionine permease, putative [Neosartorya fischeri	↑	1.6	2.1	0.9	3								
BeG90N07C10	Q8TGD1	tricarboxylate carrier, putative	↑	1.2	2.2	0.6	5								
BeE60H32G06	P15847	Trafficking protein particle complex subunit 5	↑	3.0	1.9	0.9	6	0.9	0.9	1.1	1.4	3.6	9.2	0.7	3
BeE60N12D06	Q9JL62	Glycolipid transfer protein	↑	2.3	1.7	1.1	5	1.0	1.3	1.3	1.9	2.8	2.8	1.0	7
BeG120N22G10		MFS quinate transporter	↑	1.4	1.0	0.6	5	1.0	1.0	1.1	1.2	1.7	1.0	0.9	6
BeG90N01D10	Q8WZW8	Probable YHM1 mitochondrial carrier protein	↑	1.6	1.0	0.9	5	1.0	0.9	0.8	0.8	0.9	0.8	0.7	5
BeG90N16C06	P42833	Hexose transporter HXT14	↑	2.0	1.0	0.4	5	1.1	0.9	1.2	1.5	1.9	1.1	1.0	6
BeNSVP07B10		proton glutamate symport protein	↑	0.9	1.6	1.0	3	0.8	0.8	1.0	1.2	1.4	1.8	1.0	6
BeZSPN02C07		hypothetical nicotinamide mononucleotide transporter	↑					0.9	1.1	1.1	1.0	1.2	1.6	1.1	6
BeE120N21G10	Q92356	Synaptobrevin homolog 1						0.9	1.2	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	4
BeE30N21E06		cation efflux protein/ zinc transporter						1.3	1.1	1.0	0.8	0.6	0.7	0.7	5
BeE90D07E03	O15258	RER1 protein						1.0	1.1	1.0	1.4	1.4	1.4	1.7	4
BeE90D08C11		ABC transporter 7 protein						1.1	0.9	1.1	1.0	1.2	1.0	0.7	5
BeG30N13H08	Q9JL97	GPI-anchored ceruloplasmin						1.1	1.0	1.1	0.8	0.6		0.7	5
BeG30N19E11		zinc/iron permease						1.0	1.6	1.1	0.5	0.6	1.0	0.6	5
BeZSPN09D06		hypothetical protein FG08884.1						1.0	1.0	1.0	0.9	1.1	1.1	1.4	4
BeZSPN17H06		amino acid permease-associated region							1.0	0.8	0.8	0.6	1.0	0.8	5
Transposição															
BeE60H29B05		Putative transposase	↓					1.0	0.7	0.9	0.9	0.6	0.5	1.1	2
BeZSPN17B12		Putative transposase	↓					0.9	0.8	0.8	0.9	0.7	0.6	1.2	2
Outros															
BeE30N07B02		Calmodulin (CaM)	↓	0.6	0.8										
BeE30N17E06	Q7RZV	Hypothetical protein	↓	0.6	0.8	0.9	1								
BeE30N18B10		Hypothetical protein	↓	0.5	0.8	1.0	1								
BeE60C05B10	Q882A7	Oxidoreductase, Gfo/Idh/MocA family	↓	0.5	0.7	0.9	1								
BeE60C06H06	Q7WWT9	Putative NagM-like protein	↓	0.7	0.7	0.8	4								
BeE60C15B06	Q9I264	Fe2+-dicitrate sensor	↓	0.3	0.9	0.8	2								
BeE60C25F11		hypothetical protein	↓		0.5	1.2									
BeE60C26F01		Hypothetical protein	↓	0.6	0.8	0.8	1								
BeE60H03A09		Hypothetical protein	↓	0.7	0.7	1.1	1								
BeE60N16C10		fiber protein Fb27 [Gossypium barbadense]	↓	0.1	0.9	0.9	2								

BeE60N18G11		bud site selection-related protein, putative [Cryp	↓	0.1	1.0														
BeE90N19D05	Q8NFV4	similar to abhydrolase domain containing 11	↓		0.2														
BeE90N20H07	Q7VUP2	Putative hydrolase	↓	0.4															
BeG120N03E07	P38768	Hypothetical 39.5 kDa protein	↓	0.6	1.0	1.1	1												
BeG120N20D07		Hypothetical protein	↓	0.6	0.6	1.0	1												
BeG30N06B11		hypothetical protein AN1230.2 [Aspergillus nidulan	↓	0.5															
BeG60N01F08		zinc finger protein, putative [Cryptococcus neofor	↓	0.7	0.8	0.9	1												
BeG90N03C01	O74362	Conserved hypothetical protein	↓	1.0	0.2	0.4	8												
BeE120N27B06		pyrimidine 5'-nucleotidase, putative	↓	0.6	0.8	1.0	1	1.0	1.1	1.0	1.1	0.7	1.0	1.7				4	
BeE60H31F05		similar to DC6	↓	0.5	0.8	1.0	1	0.9	0.8	0.9	0.7	0.6	0.6	1.0				2	
BeE60N16C07		similar to armadillo repeat containing 4	↓	0.5	0.8	1.3	1	1.0	0.7	0.7	0.8	0.4	0.3	0.8				1	
BeE90N06H03	Q81CV	Hydrolase	↓	0.0	0.1				0.4	0.7	0.2		0.3	1.2				8	
BeG120N02B04	P32469	Diphthine synthase	↓	0.5	0.5	0.9	1	1.0	1.0	0.8	0.9	0.5	0.4	1.1				1	
BeG30N06H12	Q8NEY6	Gastric cancer antigen Zg14 (Fragment)	↓	0.6	0.7	1.0	1	1.0	1.0	1.0	0.9	0.6	0.6	1.3				2	
BeG30N14H06		hypothetical protein CNBN1570	↓	0.6	0.7	1.1	1	1.0	0.9	1.0	0.8	0.6	0.5	0.9				2	
BeG30N20D08	Q9UUG1	Brix domain containing protein 1 homolog	↓	0.5	0.7	1.0	1	0.9	1.2	0.9	0.9		0.4	1.2				1	
BeG60N08E04	O42468	PP2A inhibitor	↓	0.5	0.6	1.0	1	1.0	1.1	0.7	0.8	0.3	0.3	1.2				1	
BeE30N06D09		N-alpha-acetyltransferase major subunit	↓					1.0	0.9	0.8	0.8	0.7	0.6	0.9				2	
BeE30N13C08	Q91V01	Putative transmembrane protein	↓					1.0	1.1	1.0	1.0	0.8	0.6	0.9				2	
BeE60N13A07	P53011	Nuclear pore protein SEH1	↓					1.2	0.8	0.9	0.8	0.5	0.5	0.7				2	
BeE60N16E08		required for meiotic nuclear division 5 homolog A	↓					1.1	1.0	0.9	0.9	0.7	0.6	0.8				2	
BeE60N17D11	O14220	Meiotic expression up-regulated protein 26	↓					0.9	1.0	0.9	1.0	0.8	0.6	0.8				2	
BeE60N19G04		similar to PRIP-interacting protein PIPMT	↓						0.9	0.8	0.9	0.6	0.5	1.0				2	
BeG30N05D12		protein arginine n-methyltransferase 1	↓					0.9	1.1	1.1	1.1	0.6	0.5	1.3				1	
BeG30N06D12	P38783	Hypothetical 15.3 kDa protein in MED6-VMA22	↓								0.4							2	
BeG60N12C04	P53738	Hypothetical 15.1 kDa protein in PET494MSO	↓					0.8	1.1	1.0	1.1	0.7	0.3	1.4				1	
BeG60N19A03	Q9W3Y0	RE14402p Zinc finger protein	↓					0.9	1.0	1.1	1.0	0.5	0.6	1.2				2	
BeZSPN15C05	Q09919	Hypothetical protein C1F7.07c in chromosome	↓						0.9		0.8		0.6	0.5				2	
BeE120N37B07	Q9C5	Dpy-30-like protein	↑	1.1	1.6	1.2	3												
BeE30N02D01		Vacuolar protein sorting-associated protein 26	↑	1.8	1.6	1.0	5												
BeE30N20C05	P97834	COP9 signalosome complex subunit 1	↑	1.4	1.0	1.1	5												
BeE60H32A03	Q7YZR8	ferritin GF2	↑	1.7	1.3	0.7	5												
BeE60N03D02	Q83L76	putative phosphohydrolase	↑	1.4	1.3	1.1	3												
BeE60N07D03		Hypothetical protein	↑	1.5	1.1	1.0	5												
BeE60N10G01	O94453	Ubiquinone biosynthesis protein COQ4	↑	1.8	1.5	1.0	5												
BeE60N11C12	Q7S952	Hypothetical protein	↑	1.4	1.2	1.2	3												
BeE60N15F12		Hypothetical protein	↑	2.1	1.8	1.0	5												
BeE90N05B08		hypothetical protein UM01058.1 [Ustilago maydis 52	↑	1.4	1.4	1.0	3												
BeG30N10E08	Q9251	Hypothetical RING finger protein	↑	1.5	1.2	0.9	5												
BeG30N14G08	Q7XJ13	Chloroplast nucleoid DNA-binding protein-li	↑	1.2		0.2													
BeG90N10E12	Q7SEL5	Hypothetical protein	↑	1.3	2.0	0.9	3												
BeNSVP03D05	Q7S9X7	Hypothetical protein	↑	1.2	2.3	2.2	3												
BeNSVP06B04		Hypothetical protein	↑		2.3	1.2													
BeZSPN10A09		Hypothetical protein	↑	1.5		0.3													
BeZSPN14F11	Q8AVD5	Similar to Benzodiazepin receptor	↑	1.6															
BeZSPN16C07	Q9251	similar to Ring finger protein 121	↑	1.6															
BeE30N07B04	P53326	Hypothetical 81.2 kDa protein in MES1-FOL2	↑	1.7	1.4	0.9	5	1.0	1.0	1.2	1.7	2.4	2.8	1.4				7	
BeE60N13B06	Q8AVD5	Similar to Benzodiazepin receptor	↑	2.2	1.8			1.0	0.9	0.8	1.1	1.5	2.1	0.7				6	
BeG120N23D09		putative protein disulfate isomerase	↑	1.5	1.8	1.1	3	1.0	1.2	1.2	1.5	1.9	1.6	0.8				6	
BeZSPN05D01		similar to Protein Mo25 (dMo25)	↑	1.8		1.2		0.9	1.2	1.0	1.3	1.5	1.9	1.0				6	
BeZSPN10F11		Multitransmembrane protein (ISS)	↑	1.7		1.3		1.1	1.1	1.1	1.5	1.7	1.6	1.1				6	
BeE120N38E10		hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]	↑					0.9	1.2	1.4	1.4	1.3	1.7	1.2				6	
BeE30N02H12		Hypothetical protein	↑					1.0	0.8	1.0	1.1	1.2	1.6	1.0				6	
BeE30N05H08		hypothetical protein [Mycobacterium vanbaalenii]	↑					0.9	1.1	1.2	1.3	1.6	1.6	1.0				6	
BeG90N06G12		acyl-coA-binding protein, ACBP	↑					1.0	1.1	1.2	1.5	1.6	1.5	1.0				6	
BeE120N27E09	O15539	Regulator of G-protein signaling 5		1.1	1.3			1.1	1.4	0.9	1.3	1.3	1.3	1.3				4	
BeZSPN10C05		Putative splicing factor			1.5	1.5		0.9	1.4	1.1		1.1	1.1	1.6				4	
BeE60N08B01	O88848	ADP-ribosylation factor-like protein 6		1.1		0.5													

BeZSPN10F01		Hypothetical protein		1.0	0.4														
BeE120N04E04		hypothetical protein						1.0	1.4	1.0	1.1	1.0	0.8	1.4	4				
BeE30N04B08		similar to intersectin 2 isoform 3						0.9	1.4	1.0	1.0	1.0	1.3	1.3	4				
BeE30N15E12		20S proteasome beta subunit						1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	1.5	0.6	5				
BeE60N09H01	O13774	GTP cyclohydrolase I						1.0	1.3	1.2	1.7	1.3	1.3	1.4	4				
BeG120N21E09		putative translation factor							1.5	1.6	0.7			0.5	5				
BeG30N02F07	Q9UU79	SPCP1E11.08 protein						0.9	1.5	1.1	1.3	1.1	1.2	1.8	4				
BeG30N18D12	Q9D2E2	Target of EGR1 protein 1							1.4		1.0				5				
BeG60N18A06		hypothetical protein SPBC354.04 [S. pombe]						1.0	1.5	1.3	1.4	1.2	1.5	1.4	4				
BeG90N04H09	P72926	Hypothetical protein sll1024						1.0	1.3	1.4	1.5	1.3	1.1	1.3	4				
BeZSPN16A08	P40157	Vacuolar import and degradation protein 27						1.0	1.5	1.2	1.3	1.2	1.3	1.5	4				
No Match																			
BeE120N02E01		No match	↓	0.6	0.8	0.8	1												
BeE120N04A06		No match	↓		0.6	1.2													
BeE120N20E11		No match	↓	0.9	0.4	0.8	4												
BeE120N24A06		No match	↓	0.6	0.8	1.4	1												
BeE120N27B04		No match	↓	0.6	0.7	0.9	1												
BeE120N28A06		No match	↓	0.8	0.9	0.6	4												
BeE120N28D05		No match	↓	0.0	0.2	0.2	7												
BeE120N29D12		No match	↓	0.6	0.7	1.1	1												
BeE120N34E05		No match	↓	0.0	1.0	1.1	7												
BeE30N06A02		No match	↓	0.6	0.9	0.9	1												
BeE30N06H08		No match	↓	0.7	0.9	1.2	1												
BeE30N17F07		No match	↓	0.7	0.7	1.0	1												
BeE30N18A10		No match	↓	0.6	1.1	1.0	1												
BeE30N21E07		No match	↓	0.4	1.0	0.9	1												
BeE60C05A01		No match	↓	0.6	0.8	0.8	1												
BeE60C14C08		No match	↓	1.0	0.7	0.9	4												
BeE60C19F04		No match	↓	0.4	1.0	1.2	1												
BeE60C25G10		No match	↓	0.7	0.8	0.5	4												
BeE60C28C01		No match	↓	0.5	0.9														
BeE60C30H06		No match	↓	0.5	1.1	1.2	1												
BeE60C31G09		No match	↓	0.7	0.7	0.7	4												
BeE60H04A08		No match	↓	0.9	0.7	1.0	1												
BeE60H10F09		No match	↓	0.9	1.6	1.7	3												
BeE60H11C06		No match	↓	0.6	0.7	1.0	1												
BeE60H24F02		No match	↓	0.7	0.8	1.0	1												
BeE60H26E03		No match	↓	0.6	0.8	1.0	1												
BeE60H26F07-1		No match	↓	0.8		0.3													
BeE60N03A10		No match	↓		0.7	0.6													
BeE60N10A10		No match	↓	0.5															
BeE60N11G03		No match	↓	0.5	1.0	1.1	1												
BeE60N14B10		No match	↓	0.9	0.7	0.7	4												
BeE60N19B06		No match	↓	0.4	0.9	0.9	1												
BeE60N19C08		No match	↓	0.4	1.1														
BeE60N19C09		No match	↓	0.6	0.5	0.4	4												
BeE90D03F09		No match	↓	0.7	0.8	0.7	4												
BeE90D04A05		No match	↓	0.7	0.9	0.9	1												
BeE90D04A06		No match	↓	0.8	0.6	0.8	4												
BeE90D15G11		No match	↓	1.0	0.8	0.6	4												
BeE90N07E01		No match	↓	0.6	1.0	1.0	1												
BeE90N07F02		No match	↓	0.3	0.9	1.3	2												
BeE90N07H12		No match	↓	0.5	0.8	0.7	1												
BeE90N12G06		No match	↓	0.4	0.8	0.8	2												
BeE90N13D06		No match	↓	0.2	1.2	1.0	2												
BeG120N07D05		No match	↓		0.4	0.4													
BeG120N12C07		No match	↓	0.8		0.4													
BeG120N15D09		No match	↓	0.6															

[illegible]

BeG60N18G09	No match	↓	0.5	0.9	1.2	1	0.9	0.9	0.8	0.5	0.4	0.3	0.7	1
BeG60N19C12	No match	↓	0.4	0.7			1.0	1.0	0.9	0.7	0.7	0.5	1.1	2
BeG90N05D09	No match	↓	0.5	0.6	0.9	1		0.9	0.8	0.7	0.6	0.6	1.0	2
BeG90N18G03	No match	↓	0.7	0.5	1.1	1	0.9	1.1	1.1	0.7	0.5	0.5	1.2	1
BeNSVP04A06	No match	↓	0.5	0.6	0.9	1	0.9	1.1	1.0	0.8	0.5	0.6	1.2	2
BeNSVP05B07	No match	↓	0.6	0.7	1.1	1		1.1	1.1	0.8	0.9	0.6	1.3	2
BeNSVP09C06	No match	↓	0.6	0.8	1.2	1	0.9	1.0	0.9	0.9	0.5	0.4	1.5	1
BeNSVP09E01	No match	↓	0.2	0.8	2.5	2	1.0	0.5	0.4	0.3	0.2	0.2	0.4	8
BeE120N06E03	No match	↓					1.1	0.8	1.1	0.9	0.9	0.7	0.8	2
BeE120N10H08	No match	↓					1.0	0.8	0.7	0.7	0.6	0.6	0.9	2
BeE30N19C11	No match	↓					1.1	1.1	0.9	0.9	0.8	0.6	1.3	2
BeE60C04F02	No match	↓					0.9	0.9	1.0	0.8	0.7	0.6	0.8	2
BeE60H09H11	No match	↓					1.0	0.8	1.0	0.9		0.6	0.9	2
BeE60N04D07	No match	↓					0.9	0.9	0.8	1.0	0.7	0.7	0.8	2
BeE60N05E11	No match	↓					0.9	0.9	0.8	0.8	0.6	0.7	0.8	2
BeE60N05G03	No match	↓					1.1	1.0	1.1	0.9	0.8	0.7	0.9	2
BeE60N17E03	No match	↓					1.0	0.9	1.0	1.0	0.8	0.6	0.7	2
BeE90N14D02	No match	↓					1.0	1.0	1.0	1.0	0.6	0.5	0.6	2
BeG120N14G12	No match	↓					1.1	1.2	1.1	1.0	0.5	0.7	1.2	2
BeG120N15H09	No match	↓											0.5	1
BeG120N22B10	No match	↓					1.1	0.9	0.7	0.7	0.6	0.5	0.7	2
BeG30N12H05	No match	↓						0.9		0.6	0.9	0.8	1.0	2
BeG60N06E08	No match	↓					0.9	0.8	0.8	0.7	0.7	0.8	0.8	2
BeG60N14B04	No match	↓					0.9	1.0	1.0	0.8	0.7	0.6	1.0	2
BeZSPN14B03	No match	↓					1.0	1.0	0.9	0.7	0.9	0.6	0.9	2
BeE120N09C09	No match	↑	1.2	1.6	0.7	3								
BeE120N37E05	No match	↑	1.5	1.6	1.0	3								
BeE30N11D11	No match	↑	1.5	1.1	1.0	5								
BeE30N14D02	No match	↑	1.4	1.2	0.9	5								
BeE60C05C02	No match	↑	1.3	1.2	0.8	5								
BeE60C15G05	No match	↑	2.3	1.1	0.7	5								
BeE60C19A10	No match	↑	1.4	1.2	0.8	5								
BeE60C31A02-1	No match	↑	2.0	1.4	0.6	5								
BeE60H15D09	No match	↑	1.6	1.4	0.9	5								
BeE60H19B03	No match	↑	1.0	1.4	1.5	3								
BeE60N05D04	No match	↑	1.5	1.1	1.0	5								
BeE60N06C09	No match	↑	1.2	1.5	1.1	3								
BeE60N08D08	No match	↑	1.5	1.4	1.1	3								
BeE90D07H03	No match	↑	1.2	1.5	1.0	3								
BeE90D09B06	No match	↑	1.2	1.6	1.1	3								
BeE90D15C08	No match	↑	4.1	3.0	0.5	6								
BeE90N02A02	No match	↑	1.3	0.8	0.8	4								
BeE90N19A07	No match	↑	1.7	1.3	0.8	5								
BeE90N19F09	No match	↑	1.9	0.9	0.8	5								
BeG30N06C01	No match	↑	1.4	1.2	0.9	5								
BeG30N13G05	No match	↑	2.7	1.5	0.9	5								
BeG30N14B07	No match	↑	2.0	1.0	1.1	5								
BeG30N14C06	No match	↑	1.2		0.2									
BeG30N14H05	No match	↑	2.8	1.3	1.0	5								
BeG30N20D01	No match	↑	1.2		0.4									
BeG60N01F05	No match	↑	1.7		0.1									
BeG60N09D12	No match	↑	1.4	1.2	0.7	5								
BeNSVP06E02	No match	↑		1.8										
BeNSVP09G10	No match	↑	1.2		0.5									
BeNSVP11G01	No match	↑	1.2		0.3									
BeZSPN09B06	No match	↑	1.2	0.3	0.4	8								
BeZSPN15D04	No match	↑	1.2		0.4									
BeZSPN15F05	No match	↑	1.9		0.6									

BeZSPN15H07	No match	↑	1.4	1.1															
BeZSPN15H09	No match	↑	1.2		0.1														
BeZSPN16E03	No match	↑	1.2		0.3														
BeZSPN16G12	No match	↑	1.8	1.1	0.8	5													
BeE120N20F10	No match	↑	1.8		1.0		1.0	1.1	1.3	1.3	1.4	1.5	1.2	6					
BeE120N28C06	No match	↑	2.2	1.5	0.8	5	1.0	1.4	1.0	1.1	2.0	1.9	0.4	6					
BeE120N28H09	No match	↑	1.0	1.4	1.1	3	1.1	1.1	1.3	1.2	1.4	1.5	1.0	6					
BeE120N35C12	No match	↑	1.4				1.1	1.2	1.0	1.2	1.4	1.5	1.1	6					
BeE30N02C02	No match	↑	5.7	2.9	0.7	6	0.9	1.3	1.3	1.4	3.8	4.3	0.6	3					
BeE30N04H12	No match	↑	1.0	1.5	1.0	3	0.9	0.7	1.0	0.9	1.1	1.5	0.9	6					
BeE30N06E10	No match	↑	2.0	1.8	0.8	5	1.0	1.1	0.8	1.0	1.5	1.6	0.8	6					
BeE30N14F05	No match	↑	2.1	1.6	0.9	5	1.0	1.3	1.5	2.1	3.5	4.0	1.1	7					
BeE30N16A03	No match	↑	1.6	1.1	0.8	5	1.0	1.0	1.1	1.5	1.9	1.9	1.0	6					
BeE30N20B08	No match	↑	1.7	1.7	1.0	3	1.0	1.3	1.5	2.4	2.4	3.2	1.1	7					
BeE60C32F10	No match	↑	3.9	2.2	0.9	6	0.9	1.4	1.3	2.4	4.0	3.9	0.8	7					
BeE60C34B10	No match	↑	1.6	1.3	0.6	5	1.0	1.0	0.7	0.9	1.0	1.0	0.5	5					
BeE60H05E07	No match	↑	1.8	1.7			1.0	1.1	1.1	1.6	4.8	3.8	1.3	7					
BeE60H08F12	No match	↑	8.1	3.5	0.4	6	0.9	1.1	0.9	1.3	4.5	15.8	0.6	3					
BeE60N01B04	No match	↑	3.3	1.7	1.0	6	0.9	1.1	1.6	3.1	7.6	5.5	1.7	7					
BeE60N01C08	No match	↑	1.0	1.7	1.1	3	1.0	1.0	1.0	1.1	1.2	1.5	0.9	6					
BeE60N12C04	No match	↑		1.5	1.1		0.9	1.4	1.1	1.3	1.6	1.7	1.4	4					
BeE60N13B09	No match	↑	1.4	2.1	1.5	3	1.1	1.0	0.8	0.9	1.1	1.1	0.6	5					
BeE60N18B07	No match	↑	2.2	1.6	1.0	5	1.0	1.4	1.4	1.7	3.7	4.4	1.3	7					
BeE90D05F08	No match	↑	5.8	2.4	0.5	6	1.1	1.0	0.6	1.3	4.3	4.5	0.6	3					
BeE90D17D01	No match	↑	1.4	1.9	0.5	5				1.0		5.6		3					
BeG30N02F02	No match	↑	1.6	1.8			1.0	1.2	1.2	1.3	1.6	2.0	1.1	6					
BeG30N09F03	No match	↑	1.3	1.4	1.3	3	0.9	1.4	1.2	1.4	1.2	1.4	1.4	4					
BeG60N20A07	No Match	↑	1.4	1.4	0.7	5	1.1	0.9	1.2	1.2	1.4	1.1	0.5	6					
BeG90N03G03	No match	↑	2.3	2.0	1.3	3	1.1	1.1	1.2	1.3	1.5	1.9	0.7	6					
BeZSPN03D11	No match	↑	1.0	1.8	1.2	3	0.8	0.7	1.1	0.9	1.3	1.7	0.8	6					
BeZSPN07B12	No match	↑	2.0	1.1	0.8	5	1.0	1.2	1.2	1.3	1.4	1.6	1.0	6					
BeZSPN09F05	No match	↑	0.9	0.2	0.4	8	0.9	0.8	1.1	1.0	1.1	1.4	0.9	6					
BeZSPN15E10	No match	↑	1.4	1.5	1.2	3	0.9	1.5	1.3	1.6	1.4	1.5	1.6	4					
BeE120N36E08	No match	↑					1.1	1.1	0.9	1.1	1.4	1.8	0.9	6					
BeE60C14A09	No match	↑					1.0	1.1		1.3	1.6	2.0	1.2	6					
BeE60C24H02	No match	↑					1.2	0.8	1.1	1.4	3.5	2.5	0.8	7					
BeE60H15G12	No match	↑					1.1	0.9	1.1	1.1	1.3	1.4	0.9	6					
BeE60H26G08	No match	↑					1.1	0.9	1.0	1.1	1.3	1.9	0.9	6					
BeE90D14D07	No match	↑					1.1	1.0	1.1	0.9	1.5	2.3	0.8	6					
BeG120N09E12	No match	↑					1.0	1.2	1.1	1.2	1.7	1.6	1.1	6					
BeG30N06A12	No match	↑					1.0	1.2	1.2	1.4	1.5	1.6	1.1	6					
BeG30N13C07	No match	↑					0.9	1.2	1.0	1.1	1.2	1.5	1.1	6					
BeNSVP07F06	No match	↑					0.8	0.9	1.1	1.3	1.6	2.0	1.0	6					
BeNSVP12C06	No match	↑					1.0	1.1	1.1	1.1	1.3	1.2	1.0	6					
BeZSPN02B03	No match	↑					0.9	1.0	1.0	1.2	1.4	1.7	1.0	6					
BeZSPN02C06	No match	↑					0.9	1.0	0.9	1.0	1.1	1.5	0.9	6					
BeZSPN02G02	No match	↑					0.9	1.0	0.9	1.1	1.1	1.5	0.5	6					
BeZSPN03B07	No match	↑					0.9	0.9	0.9	1.0	1.2	1.4	1.1	6					
BeZSPN03D08	No match	↑					0.9	0.9	0.9	1.1	1.3	1.6	1.0	6					
BeZSPN03E07	No match	↑					0.9	0.9	1.0	1.2	1.4	1.6	1.0	6					
BeZSPN11B10	No match	↑					0.8	0.8	0.9	1.0	1.1	1.5	0.9	6					
BeZSPN12D03	No match	↑					1.0	0.9	1.1	1.0	1.2	1.4	1.0	6					
BeZSPN17D01	No match	↑					1.0	1.2	1.0	1.3	1.2	1.5	1.2	6					
BeG120N10C05	No match		0.6	0.9	1.2	1	0.8	1.4	1.0	1.1	1.1	1.6	1.0	6					
BeG60N06H10	No match		1.0	1.9	1.1	3	1.1	1.0	0.7	0.5	0.5	0.8	0.8	2					
BeE120N20C04	No match		1.0	0.9	0.7	4													
BeE60N06F03	No match				0.2														
BeG120N14B03	No match				0.3														

[illegible]

Tabela S 2: Lista completa dos genes diferencialmente expressos por carência de ferro (II) e comparação com os microarranjos de hipóxia gradual e direta. Os valores representam a razão de expressão (teste/C70). As setas indicam os perfis de indução (para cima) ou repressão (para baixo).

Clone ID	SwissProt	Anotação	Razão expressão DPY	Perfil em HG/HD	Hipóxia Direta				Hipóxia Gradual							
					C1_1h	C1_5h	C70r_1h	Kmeans HD	C70	C35	C17.5	C5	C1	C0	C70r	Kmeans HG
Metabolismo de Aminoácidos																
BeG90N11B07		acetolactate synthase Ilv2 [Filobasidiella neoform	0.3													
BeG30N08D01	Q9Y3D8	Adenylate kinase isoenzyme 6	0.5	↓	0.9	0.6	0.9	4	1.0	1.0	1.0	0.9	0.6	0.6	1.1	2
BeG60N02D07		glycine cleavage system H protein (16.0 kD)	0.5						1.0	1.0	0.8	1.0	1.0	1.0	0.6	5
BeE60N17D10		asparagiNyl tRNA Synthetase NRS-1 (61.2 kD) (nrs-1	0.6													
BeE60H21G01		homogentisate 1,2-dioxygenase	0.6						1.0	1.4	1.2	1.3	0.9	1.0	0.9	4
BeE60H28B12	Q96VZ6	Acetolactate synthase Ilv2	0.6	↓	0.4	0.5	2.9	1	1.0	1.2	1.5	1.3	0.3	0.3	1.5	1
BeE30N02B01	O04974	2-isopropylmalate synthase B	0.6													
Ciclo Celular																
BeE120N28B12	Q9C1M3	Septin	0.6													
BeE60H26C08	Q9P3A7	Cell division cycle protein 48 homolog	1.7						1.0	0.9	0.9	1.1	0.9	1.0	0.7	5
Estrutura de Cromatina																
BeG30N17G05	Q1469	programmed cell death 11	0.6	↓	0.9	0.7	0.9	4								
Metabolismo Energético																
BeE90D08B03		glycogen storage control protein, putative [Cryptococcus	0.3													
BeE120N27B02	P56205	Cytochrome c	0.3	↓	0.6	0.7	1.0	1	1.0	0.9	0.9	0.9	0.5	0.3	1.4	1
BeG120N23E11	Q99L23	NADH dehydrogenase (Fragment)	0.3													
BeG120N07H08	O74699	Aconitase	0.4	↓					1.0	0.9	0.8	0.9	1.0	0.8	1.4	2
BeE120N27B03	Q03015	NADH-ubiquinone oxidoreductase 12 kDa subunit	0.5	↓					1.1	0.8	0.9	0.9	0.8	0.7	1.0	2
BeZSPN09F10	Q8J267	Aconitase (Fragment)	0.5													
BeE120N08B02		aconitase 2, mitochondrial [Danio rerio]	0.5													
BeE120N20G02	O97725	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit B17.	0.6													
BeG30N12E07	Q9P8D2	Cytochrome c oxidase subunit V	0.6	↑	1.4	1.2	0.9	5								
BeE120N37A09	Q7SGS6	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit precursor	0.6													
BeG90N12C05		glutaryl-Coenzyme A dehydrogenase isoform a	0.6	↓					1.0	1.0	0.9	0.7	0.6	0.4	0.9	2
BeG30N06H08		Isocitrate lyase (Isocitrase) (Isocitratase) (ICL)	0.6													
BeG90N18D03		Similar to cytochrome c-1 [Xenopus laevis]	0.7													
BeG120N10C03		NADH-ubiquinone oxidoreductase 30.4 kDa subunit, p	0.7													
BeE120N01B06	P17568	NADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit	0.7													
BeE120N01B08		NADH-ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit, put	0.7													
BeG60N09E05	P52504	NADH-ubiquinone oxidoreductase 13 kDa-A sub	0.7													
BeE60H08E04	Q9A212	Quinone oxidoreductase	1.6	↑	1.2	1.5	1.0	3								
BeE60N10B03		vacuolar ATP synthase subunit c''	1.6	↑	2.1	1.3	0.9	5	0.9	1.2	1.1	1.4	2.3	2.2	0.8	6
BeE30N03G09	Q7PRL2	V-type ATPase proteolipid subunit	1.6													
BeE120N28B05	P48826	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1.6													
BeE60N05D05	Q8EBH2	Transaldolase	1.8	↑	1.5	1.5	1.0	3	1.1	1.0	1.0	1.2	1.6	3.1	0.8	6
BeE30N04H06	Q9Z2K9	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	1.8	↓					1.1	1.3	1.2	1.1	0.6	0.8	1.0	2
BeE60N18F02	P48826	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1.8													
BeE30N21H07	P06738	Glycogen phosphorylase	2.0	↑	1.3	2.0	1.0	3	1.1	1.1	0.9	1.2	1.4	1.7	0.7	6
BeG90N11A02	Q90WD9	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	2.2	↑	1.9	2.4	1.2	3	1.0	1.4	1.3	2.0	2.3	2.6	0.9	7
Metabolismo de Lipídeos																
BeE90D17G07	Q9P4D7	Long chain polyunsaturated fatty acid elongation enzyme	1.4		0.6	1.0	0.8	1	1.0	1.0	1.1	1.4	1.2	1.3	0.6	6
BeE60H26A05	Q872A4	Related to phosphatidylserine decarboxylase	1.7	↑	5.0	2.6	1.0	6	0.9	1.8	2.5	6.1	####	####	2.7	7
BeG90N07B07	Q7Q192	leukotriene A4 hydrolase	1.7	↑	1.6	1.1	0.7	5								

BeE60N03G10	Q7SBV0	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	1.9	↑					1.1	1.8	1.5	3.8	8.9	5.7	2.0	7
BeZSPN11E04		deoxyhypusine hydroxylase	2.5													
BeZSPN15E12		deoxyhypusine hydroxylase/monooxygenase	3.4													
Metabolismo de Ácidos Nucleicos																
BeE90D15C05	O94413	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	0.5	↑	1.9	1.7	1.3	3	1.1	0.9	0.9	0.9	1.4	1.7	0.9	6
BeG30N12D07	O93937	PyrABCN	0.5	↓	0.7	1.2	2.0	1	1.0	0.7	0.4	0.7	0.6	0.8	0.9	2
BeG30N04E02	P50094	Probable inosine-5'-monophosphate dehydroge	0.6													
BeZSPN03F10		probable inosine-5\'-monophosphate dehydrogenase	0.6	↑	1.1	1.5	1.4	3								
Enovelamento e Modificação de Proteínas																
BeE120N06B11	Q8CEE6	PAS domain containing serine/threonine kinase	0.3													
BeG30N13C06		Ribosomal RNA processing protein 28	0.5	↓					0.9	1.1		0.9		0.6	1.0	2
BeE30N18D09	Q8UGX7	Peptide methionine sulfoxide reductase msrB	0.6													
BeE30N03D10	P25007	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1.4													
BeE30N21E09	Q7ZWL1	Similar to prolyl endopeptidase (Fragment)	1.4													
BeE60H28G06	O73817	Proteasome subunit beta type 3	1.5													
BeE60H23C11	Q9W227	similar to peptidylprolyl isomerase B isoform 1	1.5													
BeE60N10D10		proteasome subunit alpha type-4	1.5													
BeG120N08G03	Q13200	26S proteasome non-ATPase regulatory subuni	1.5													
BeE60N15G05		DnaJ-like protein MsJ1 - alfalfa	1.6	↑	1.6	1.2	1.0	5	1.1	1.1	1.3	1.4	2.4	2.7	0.8	7
BeE60N13G06	Q96U28	Probable 26s proteasome p44.5 protein	1.7													
BeG30N09H07	P52493	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa	1.8													
BeE60H17C06	P52495	Ubiquitin-activating enzyme E1 1 (Fragment)	1.8	↑					1.0	1.1	1.1	1.4	1.1	1.1	0.7	6
BeE90D05G05	Q7Z8F2	Putative serine/threonine phosphatase 2C ptc2	1.8	↑	2.3	1.9	0.9	5	1.0	1.3	1.5	2.2	4.9	4.8	0.9	7
BeZSPN13B02	Q9HF04	Vacuolar serine protease	1.9													
BeG90N22C02	Q9PTW9	Proteasome subunit alpha type 7	1.9													
BeE60N14C07	O14413	Proteinase A	2.2													
Homeostase Redox																
BeE60N14F11	Q9BGI3	Peroxiredoxin 2	1.3	↑					0.7	1.1	1.2	1.3	1.3	1.3	1.1	6
BeE90D16C06	P91252	Probable glutathione S-transferase 6	1.4													
BeE60C04G01	O14463	Thioredoxin	1.5													
BeE60C31E12	Q94GY8	Putative glutathione S-transferase	2.0													
BeE120N37A02	Q94GY8	Putative glutathione S-transferase	2.1													
BeE60H11C04	Q7YXM3	peroxiredoxins [Phanerochaete chrysosporium]	3.2													
BeE60C19G01		Thioredoxin peroxidase	3.4	↓	0.6	1.1	1.0	1								
Proteínas Ribossomais / Tradução																
BeG60N15D01	O7469	SNU13 snRNP subunit homolog	0.3	↓	0.6	0.5	0.9	1	1.0	0.9	0.9	0.8	0.4	0.2	1.2	1
BeG90N10A10	P32495	High mobility group	0.4	↓		0.5	0.9		1.0	1.0	0.9	0.9	0.5	0.4	1.2	2
BeG120N20E02	Q9NPE3	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3	0.4	↓	0.4	0.4	0.9	2	0.9	0.9	1.1	0.9	0.3	0.3	1.3	2
BeG120N02A10	Q09916	Putative ATP dependent RNA helicase C1F7.02	0.4	↓	0.6	0.6	0.9	1	1.0	1.0	0.9	0.9	0.4		1.1	1
BeG120N22A08	P38805	Ribosome biogenesis protein RPF1	0.5													
BeG90N04A04		Probable eukaryotic translation initiation factor	0.5	↓	0.6	0.7	1.1	1								
BeZSPN17H02		similar to Fibrillarin CG9888PA	0.6	↓					1.0	1.0	0.9	0.9	0.5	0.4	1.1	2
BeG90N19G08	Q8S1Z1	U3 small nucleolar RNA-associated	0.6													
BeG120N04E02		Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 1A	0.7	↓					0.9	0.9	0.9	0.8	0.7	0.6	1.0	2
BeE90N16A07	Q7MXM0	Aspartyl-tRNA synthetase	1.8													
BeE90D07H12	P25444	40S ribosomal protein S2	1.8													
Transdução de Sinal																
BeE90D03C08	Q8BWJ3	Phosphorylase B kinase alpha regulatory chain, liver isoform	0.7													
BeZSPN16D09	Q12741	cAMP-dependent protein kinase catalytic sub	1.4	↑	1.2	1.4	1.3	3								
BeG90N08A02	Q9W711	activated protein kinase C receptor	1.5	↑	0.9	1.4	1.1	3								
Resposta a Estresse																
BeG60N07C03	Q9S9N1	Hsp70-3 (Blastocladiella emersonii)	0.7	↓					1.1	1.0	0.8	0.8	0.6	0.7	1.0	2
BeE60H30A07	Q8I8Z4	Heat shock protein 90 (Fragment)	1.6													
Estrutura Celular / Microtúbulos																
BeE90N19F03	Q8WXX0	Ciliary dynein heavy chain 7	0.5													
BeE60N10H11		kinesin heavy chain	0.6													
Transcrição / Processamento de RNA																
BeG90N10B01		DNA-directed RNA polymerase I subunit D protein	0.5	↓	0.6	0.6	1.0	1	0.9	1.0	0.9	0.9	0.5	0.5	1.3	2
BeE30N22H05	O81098	RNA polymerase I, II and III 24.3 kDa subun	0.6	↓	0.2	0.7	1.0	2								
BeE90D08E03	P34253	RNA polymerase II elongator-associated protein	1.9	↑	2.1	1.7	0.9	5	1.0	1.2	1.5	2.0	3.9	4.5	0.9	7

Transporte																
BeG60N20F09	Q872I6	Probable iron inhibited ABC transporter 2 G	0.4	↓	0.7	0.7	1.0	1	1.0	1.0	1.1	1.0	0.7	0.7	1.4	2
BeZSPN05F06		hypothetical protein [Neurospora crassa]	0.5	↓					1.0	1.0	1.0	0.9	0.7	0.8	1.5	2
BeE60C03A02		Cation/multidrug efflux pump [Pseudomonas	0.6													
BeE60N18C10		Acyl carrier protein, mitochondrial precursor (ACP	0.6													
BeE60N18A11		putative phosphate/phosphoenolpyruvate translocator	0.7	↓					1.0	1.0	0.9	1.0	0.8	0.6	0.8	2
BeNSVP07B10		proton glutamate symport protein	1.4	↑	0.9	1.6	1.0	3	0.8	0.8	1.0	1.2	1.4	1.8	1.0	6
BeG60N01F09		methionine permease, putative [Neosartorya fischeri	1.8	↑	1.6	2.1	0.9	3								
BeE60N12D06	Q9JL62	Glycolipid transfer protein	2.0	↑	2.3	1.7	1.1	5	1.0	1.3	1.3	1.9	2.8	2.8	1.0	7
BeG30N13H08	Q9JL97	GPI-anchored ceruloplasmin	2.5						1.1	1.0	1.1	0.8	0.6		0.7	5
BeZSPN15C05		high-affinity iron permease [Rhizopus oryzae]	2.7	↓						0.9		0.8		0.6	0.5	2
BeG90N02G07	Q8JZT2	S-adenosylmethionine mitochondrial carrier protein	2.7													
BeG30N20G10		ABC transporter-like protein [Arabidopsis thaliana	3.3													
BeG120N25D02	Q92341	siderophore iron transporter mirC	4.9													
BeG30N19E11		zinc/iron permease	8.9						1.0	1.6	1.1	0.5	0.6	1.0	0.6	5
Outros																
BeE90N06H03	Q81CV0	Hydrolase	0.2	↓		0.1				0.4	0.7	0.2		0.3	1.2	8
BeE60C18D04	Q8FW89	Quinone oxidoreductase	0.2													
BeNSVP04C06	P19727	Minor capsid protein 10B	0.3													
BeG30N08D09	Q92R40	Hypothetical protein	0.3													
BeG30N20D08	Q9UUG1	Brix domain containing protein 1 homolog	0.3	↓	0.5	0.7	1.0	1	0.9	1.2	0.9	0.9		0.4	1.2	1
BeG60N08E04	Q42468	PP2A inhibitor	0.4	↓	0.5	0.6	1.0	1	1.0	1.1	0.7	0.8	0.3	0.3	1.2	1
BeE60C21A11	Q88FF9	Outer membrane siderophore receptor	0.4													
BeG60N12C05	Q9BQ67	Glutamate-rich WD-repeat protein 1	0.5													
BeG60N12C04	P53738	Hypothetical 15.1 kDa protein in PET494MSO	0.5	↓					0.8	1.1	1.0	1.1	0.7	0.3	1.4	1
BeG90N07D08	Q8EIN1	Alkaline phosphatase, putative	0.5													
BeE30N07B04	P53326	Hypothetical 81.2 kDa protein in MES1-FOL2	0.6	↑	1.7	1.4	0.9	5	1.0	1.0	1.2	1.7	2.4	2.8	1.4	7
BeE60C15B06		Fe2+-dicitrate sensor	0.6	↓	0.3	0.9	0.8	2								
BeZSPN14H05		histidinol phosphate aminotransferase	0.6	↓	0.7	1.0	1.4	1	1.0	0.7	0.7	0.7	0.3	0.2	0.7	1
BeE90D02B04	P25338	Hypothetical 20.2 kDa protein in PRS2-LEU1 intergenic region	0.6													
BeE60C25F11		hypothetical protein	0.6	↓		0.5	1.2									
BeG120N18B05		hypothetical protein [Entamoeba histolyt	0.6													
BeG30N15E09		hypothetical protein	0.7													
BeE60N16C10		fiber protein Fb27 [Gossypium barbadense]	0.7	↓	0.1	0.9	0.9	2								
BeG30N10H02		zinc finger, HIT type 6	0.7													
BeE60C05B10	Q882A7	Oxidoreductase, Gfo/Idh/MocA family	0.7	↓	0.5	0.7	0.9	1								
BeG30N18H02	Q14236	gtp-binding protein associated	0.7													
BeE60C06H06	Q7WWT9	Putative NagM-like protein	0.7	↓	0.7	0.7	0.8	4								
BeG60N03C11		Hypothetical protein	0.7													
BeG120N02B04	P32469	Diphthine synthase	0.7	↓	0.5	0.5	0.9	1	1.0	1.0	0.8	0.9	0.5	0.4	1.1	1
BeE90N11H01		hypothetical protein	0.7													
BeZSPN12D07	Q7SH92	Hypothetical protein	1.4													
BeZSPN16B05	Q9NY68	Hypothetical protein	1.5													
BeG120N23D09		putative protein disulfate isomerase	1.5	↑	1.5	1.8	1.1	3	1.0	1.2	1.2	1.5	1.9	1.6	0.8	6
BeNSVP06B04		Hypothetical protein	1.7	↑		2.3	1.2									
No Match																
BeE60N06F03		No match	0.0				0.2									
BeZSPN18D04		No match	0.1	↓	0.2	0.1										
BeE120N28D05		No match	0.1	↓		0.2	0.2	7								
BeG90N22E03		No match	0.1													
BeE60C03D07		No match	0.1	↓					1.1	0.5	0.7	0.4	0.9	0.4	1.2	2
BeNSVP12C06		No match	0.2	↑					1.0	1.1	1.1	1.1	1.3	1.2	1.0	6
BeG90N18A04		No match	0.3													
BeE120N02E01		No match	0.4	↓	0.6	0.8	0.8	1								
BeG90N19A08		No match	0.4	↓	0.4	0.6	0.8	2								
BeG60N18C02		No match	0.4	↓	0.6	0.7	1.1	1	0.9	1.0	1.1	1.0	0.4	0.5	1.2	1
BeE60N15C03		No match	0.4													
BeG60N14B04		No match	0.4	↓					0.9	1.0	1.0	0.8	0.7	0.6	1.0	2
BeG60N07A06		No match	0.4													
BeE60N04D07		No match	0.4	↓					0.9	0.9	0.8	1.0	0.7	0.7	0.8	2

BeG60N07A03	No match	0.4																	
BeE60C28C01	No match	0.4	↓	0.5	0.9														
BeE90D02E01	No match	0.4																	
BeE60C25A12	No match	0.4																	
BeE60N13G01	No match	0.5																	
BeG60N04H08	No match	0.5	↓	0.6	0.6	1.0	1												
BeNSVP03B04	No match	0.5																	
BeE60C29F06	No match	0.5																	
BeG60N17D07	No match	0.5	↓	0.6	0.6	0.9	1	0.9	1.0	0.9	1.0	0.7	0.7	1.0					2
BeNSVP09E01	No match	0.5	↓	0.2	0.8	2.5	2	1.0	0.5	0.4	0.3	0.2	0.2	0.4					8
BeE60C08F10	No match	0.5																	
BeNSVP09H06	No match	0.5	↓	0.8	0.5	1.2	1												
BeE60H11C06	No match	0.5	↓	0.6	0.7	1.0	1												
BeE120N25H08	No match	0.5																	
BeE60C10C09	No match	0.5																	
BeE120N06D02	No match	0.5																	
BeG60N20F04	No match	0.5																	
BeE90D11H09	No match	0.5	↓	0.5	1.2	1.5	1	0.9	0.6	0.7	0.9	0.4	0.3	0.8					1
BeG30N10A03	No match	0.6																	
BeE90N18C02	No match	0.6																	
BeNSVP05B07	No match	0.6	↓	0.6	0.7	1.1	1		1.1	1.1	0.8	0.9	0.6	1.3					2
BeE30N17F07	No match	0.6	↓	0.7	0.7	1.0	1												
BeE120N27B04	No match	0.6	↓	0.6	0.7	0.9	1												
BeE60C05A01	No match	0.6	↓	0.6	0.8	0.8	1												
BeE90D03E07	No match	0.6																	
BeE120N32B08	No match	0.6	↓	0.7	0.8	1.1	1	1.0	0.8	0.8	0.9	0.7	0.6	1.1					2
BeE90D04A06	No match	0.6	↓	0.8	0.6	0.8	4												
BeE60N04D03	No match	0.6																	
BeE120N02C09	No match	0.6	↓	0.5	0.4	1.7	1	1.0	1.0	1.1	1.0	0.3	0.4	1.2					1
BeE120N21E02	No match	0.6																	
BeZSPN10G09	No match	0.6																	
BeNSVP09C06	No match	0.6	↓	0.6	0.8	1.2	1	0.9	1.0	0.9	0.9	0.5	0.4	1.5					1
BeG30N20G02	No match	0.6	↓	0.6	0.7	1.0	1												
BeE30N14E05	No match	0.6	↓	0.5	0.7	0.9	1	1.0	0.9	0.9	0.9	0.6	0.4	0.7					2
BeE90D03F09	No match	0.6	↓	0.7	0.8	0.7	4												
BeE30N20G07	No match	0.6																	
BeG90N18G03	No match	0.6	↓	0.7	0.5	1.1	1	0.9	1.1	1.1	0.7	0.5	0.5	1.2					1
BeE120N02H03	No match	0.6	↓	0.5	0.5	1.0	1	0.9	0.8	1.0	0.8	0.6	0.5	1.0					2
BeG30N08C10	No match	0.6																	
BeNSVP10H03	No match	0.6																	
BeG30N19F03	No match	0.7																	
BeZSPN06H07	No match	0.7																	
BeE60C29H10	No match	0.7																	
BeG30N10E11	No match	0.7																	
BeNSVP01G12	No match	0.7																	
BeG30N11D04	No match	0.7	↓	0.6	0.6	0.8	1												
BeG90N10C12	No match	0.7																	
BeG60N18G09	No match	1.4	↓	0.5	0.9	1.2	1	0.9	0.9	0.8	0.5	0.4	0.3	0.7					1
BeE90D17B09	No match	1.4																	
BeE60N08A09	No match	1.5																	
BeZSPN03D11	No match	1.5	↑	1.0	1.8	1.2	3	0.8	0.7	1.1	0.9	1.3	1.7	0.8					6
BeE120N28H09	No match	1.5	↑	1.0	1.4	1.1	3	1.1	1.1	1.3	1.2	1.4	1.5	1.0					6
BeE30N04H12	No match	1.5	↑	1.0	1.5	1.0	3	0.9	0.7	1.0	0.9	1.1	1.5	0.9					6
BeE30N19C11	No match	1.6	↓					1.1	1.1	0.9	0.9	0.8	0.6	1.3					2
BeE90D14C03	No match	1.6																	
BeNSVP02H10	No match	1.6																	
BeNSVP07F10	No match	1.6																	
BeE120N24A06	No match	1.7	↓	0.6	0.8	1.4	1												
BeG60N06H10	No match	1.7		1.0	1.9	1.1	3	1.1	1.0	0.7	0.5	0.5	0.8	0.8					2
BeE60H15D02	No match	1.7	↓	0.6	1.1	0.8	1	1.0	0.9	0.9	1.1	0.6	0.8	0.7					5
BeE60N18B07	No match	1.9	↑	2.2	1.6	1.0	5	1.0	1.4	1.4	1.7	3.7	4.4	1.3					7
BeE60N12F10	No match	2.0																	

BeE60H28C01	No match	2.1													
BeE120N38F02	No match	2.1													
BeE30N14F05	No match	2.3	↑	2.1	1.6	0.9	5	1.0	1.3	1.5	2.1	3.5	4.0	1.1	7
BeE30N20B08	No match	2.4	↑	1.7	1.7	1.0	3	1.0	1.3	1.5	2.4	2.4	3.2	1.1	7
BeG90N01C12	No match	3.3						1.1	0.9	1.1	0.9	0.9	0.7	0.7	5
BeNSVP04A06	No match	3.6	↓	0.5	0.6	0.9	1	0.9	1.1	1.0	0.8	0.5	0.6	1.2	2
BeNSVP01A12	No match	3.8													
BeE60H26C07	No match	4.1								1.1	1.1			2.4	4
BeE60H10F09	No match	6.9	↓	0.9	1.6	1.7	3								

Tabela S 3: Lista completa dos genes diferencialmente expressos no experimento de hipóxia + geldanamicina. Os valores são expressos em número de vezes reprimido. As setas indicam os perfis de expressão dos experimentos de hipóxia gradual e/ou direta (HG/HD) e no experimento de carência de ferro (II) (DPY).

Clone ID	SwissProt	Anotação	Veze reprimido HD / HD+GA	Perfil em HG/HD	Perfil em DPY
Metabolismo de Aminoácidos					
BeG9N7G3		glutamate dehydrogenase, NAD(P)+	-6.3		
Reparo de DNA					
BeG3N14F1		ATP-dependent DNA helicase pcra	-13.3		
Metabolismo Energético					
BeE6N5D5	Q8EBH2	Transaldolase	-1.6	↑	↑
BeG9N18E8	Q8X97	Probable ATP-citrate synthase subunit 1	-1.7	↑	
BeE12N3E1	Q8ZN3	D-lactate dehydrogenase	-1.4	↑	
Metabolismo de Lipídeos					
BeE6H26A5	Q872A4	Related to phosphatidylserine decarboxylase	-1.6	↑	↑
BeG6N6G5	P7978	Delta-9 fatty acid desaturase	-2.0	↑	
BeZSPN14C8		lysophospholipase [Ajellomyces	-6.9		
BeG9N7B7		leukotriene A4 hydrolase	-1.5	↑	↑
BeG9N15A12		fatty acid elongase (Gig3)	-5.3		
Metabolismo de Ácidos Nucleicos					
BeG9N17F7		carbamoyl-phosphate synthase arginine-specific large chain	-19.6		↓
Proteínas Ribossomais / Tradução					
BeG12N16D6		mitochondrial S4 ribosomal protein [Saccharomyces	-11.8		
BeE3N21H12	O13418	6S ribosomal protein L15	-1.6		
BeG9N11F1	Q8ISP7	ribosomal protein L9	-1.3		
BeG3N2A1		similar to Ribosomal protein, large, P1	-7.6		
BeG12N6A4	Q9SIP7	4S ribosomal protein S3	-1.5		
BeG3N5H6	P5288	6S ribosomal protein L3-1	-1.3		
BeG3N5A5		translational activator GCN1, putative	-6.8		
BeG9N16F8		methionine aminopeptidase [Schizosaccharomyces	-7.2		
Transdução de Sinal					
BeE6C14H8	Q886H3	Sensor histidine kinase	-9.8		
BeG3N17E1		serine/threonine protein kinase FSK [Cryptococcus	-19.8		
BeG3N7D9		histidine acid phosphatase, IP6 and IP7 kinase, inositol pyrophosphate synthase, putative [Candida dubliniensisputative;	-25.8		
BeNSVP7F1		cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit [Blastocladiella	-1.4		
Estrutura Celular / Microtúbulos					
BeE6N13F3		beta-tubulin [Blastocladiella emersonii]	-1.5	↑	
BeE9N19F3	Q8WXX	Ciliary dynein heavy chain 7	-9.3		↓
Transcrição / Processamento de RNA					
BeZSPN17G9	Q8BU5	DNA-directed RNA polymerases III 12.5 kDa	-43.1	↓	
BeG12N19C7		RNA polymerase II largest subunit [Blastocladiella emersonii]	-26.2		↓
Q88LS5		Transcriptional regulator, LysR family	-14.4		
Transporte					
BeG12N15C5		H ⁺ /nucleoside cotransporter	-23.6		
BeG9N7C1	Q8TGD1	tricarboxylate carrier, putative	-5.8	↑	
Outros					
BeE9N6H3	Q81CV	Hydrolase	-29.5	↓	↓
BeE9N12E11	Q8DCG4	Predicted Zn-dependent proteases	-8.0		
BeZSPN14G4		FAD-dependent oxidoreductase	-8.6		

BeE9N2G7		mitochondrion organization and biogenesis-related protein	-24.4		
BeG3N13E7		ATP-dependent RNA helicase	-1.3		
BeZSPN18A12	Q9NUN7	Alkaline phytoceramidase	-24.8		↓
BeE6N6E1	Q7TPT3	Exocyst complex component 7	-14.5		
BeG9N16H4	Q9BUH4	similar to Serine/threonine-protein kinase 16	-7.1		
BeG9N6G2		oxidoreductase, acting on the CH-CH group of donors	-14.3		↓
BeE9N12C6	Q88E1	Filamentous hemagglutinin, intein-containing	-12.4		
BeE9N21D6		aminomethyltransferase family protein	-6.6		
BeG3N19H5		hypothetical protein	-6.8		
BeE6C12B7	Q9I3X9	Probable siderophore receptor	-1.9		
BeG3N16C3		leucine rich repeat (LRR) protein	-3.5		
BeNSVP4C6	P19727	Minor capsid protein 1B	-5.5		
BeE9D17A8	Q7ZY47	ATP-dependent RNA helicase DDX42	-4.8	↓	
BeZSPN12G2		GTP-binding family protein	-8.6		↑
BeE6C16F1	Q8XQU5	short chain dehydrogenase [Plesiocystis	-8.9		
BeE6C4B1		putative secreted protein [Xanthomonas	-7.9		
BeG3N3F11	P4493	Hypothetical 39.4 kDa protein	-7.4		
BeG3N13D9		mitochondrial import receptor subunit tom2	-23.9		
No Match					
BeE6C3D7		No match	-44.3	↓	
BeG9N1E4		No match	-12.5	↓	
BeG3N14H11		No match	-9.7		
BeG6N17C11		No match	-6.5		
BeG6N2C11		No match	-22.9		↓
BeG6N14D7		No match	-14.3		↑
BeG12N17C3		No match	-11.4		
BeG3N14E3		No match	-20.0		
BeG3N7D1		No match	-9.5		↓
BeG9N15D8		No match	-8.6		
BeG3N9G12		No match	-26.7		
BeG6N15C2		No match	-8.5		
BeG3N2E1		No match	-18.9		
BeZSPN9A7		No match	-7.1		
BeE12N28D5		No match	-14.7	↓	
BeE9N21C6		No match	-1.8		
BeZSPN18D4		No match	-29.5	↓	
BeG3N7F11		No match	-5.8		
BeG9N12A4		No match	-6.9		
BeE6N1B4		No match	-1.7	↑	
BeG6N2F4		No match	-13.6		↓
BeE3N6F5		No match	-2.3		
BeG3N8F1		No match	-11.9		
BeG3N9B8		No match	-7.3		
BeG3N8B1		No match	-6.7		
BeE6C5A1		No match	-8.8	↓	
BeG3N6B1		No match	-11.3		
BeE9D14D7		No match	-1.9	↑	
BeE6N6F3		No match	-7.6		
BeG3N1E6		No match	-7.4		
BeG9N8D5		No match	-1.6	↓	
BeG9N19E8		No match	-9.4		
BeG6N1B2		No match	-7.6		
BeG9N1F9		No match	-7.2		
BeG6N17F7		No match	-8.6		↓
BeG9N21H2		No match	-5.7		
BeNSVP4A6		No match	-1.7	↓	
BeG3N2A4		No match	-11.7		
BeG3N16D8		No match	-8.4		
BeG9N9A3		No match	-6.5		
BeG3N2F4		No match	-2.3		
BeG9N14A8		No match	-22.6		
BeG9N14F4		No match	-1.9		

BeZSPN15A6	No match	-6.0		
BeG3N2H3	No match	-7.5		
BeNSVP9H6	No match	-5.7	↓	
BeE6N18B7	No match	-1.4	↑	
BeE6H8F12	No match	-1.7	↑	
BeNSVP7G2	No match	-1.4		
BeG9N22E3	No match	-5.2		
BeG9N3F11	No match	-9.7		
BeZSPN3E6	No match	-6.6		
BeZSPN7G9	No match	-6.7		↑
BeG3N9D6	No match	-6.6		
BeG3N14E4	No match	-5.3		↓
BeG6N3F1	No match	-14.3		
BeG9N8A4	No match	-6.3		
BeG6N15D8	No match	-8.3		
BeZSPN13H1	No match	-13.3		
BeZSPN8E5	No match	-4.7		

9 SÚMULA CURRICULAR

Nome: César Moisés Camilo

Local e data de nascimento: Guarulhos, SP, 10 de fevereiro de 1982

Educação:

Ensino Médio:

Colégio Integrado – Rio Claro/SP

1997 a 1999

Graduação:

Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – São Paulo/SP

Farmácia e Bioquímica (Modalidade Análises Clínicas e Toxicológicas)

2000 a 2005

Ocupação:

2001 a 2002 - Bolsista de Iniciação Científica PIBIC-CNPq - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - USP

2002 a 2003 - Bolsista de Iniciação Científica FIPFARMA - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – USP

2004 a 2005 - Bolsista de Iniciação Científica FAPESP - Instituto de Química, Departamento de Bioquímica – USP

2005 a 2009 - Bolsista de Doutorado Direto CAPES - Instituto de Química, Departamento de Bioquímica – USP

Publicações:

Artigos Completos

Camilo, C.M.; Assunção, N.A.; Bechara, J.H.E; Gomes, S.L. "Transcriptomic and metabolic response of *Blastocladiella emersonii* to hypoxia and transient anoxia" (Manuscrito em preparação).

Salinas, R.K.; **Camilo, C.M.;** Tomaselli, S.; Valencia, E.Y.; Farah, C.S.; El-Dorry, H.; Chamberg, F.S. "Solution structure of the C-terminal domain of multiprotein bridging factor 1 (MBF1) of *Trichoderma reesei*." *Proteins*, v. 75, p. 518-523, 2009.

- Salinas, R.K.; **Camilo, C.M.**; Farah, C.S.; El-Dorry, H.; Chambergo, F.S. “¹H, ¹⁵N and ¹³C backbone NMR assignments of a multiprotein bridging factor 1 from *Trichoderma reesei* (TrMBF1, 56-159).” Activity Report (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron), v. 1, p. 1-2, 2006.
- Salazar, P.M.N.; Ropke, C.D.; **Camilo, C.M.**; Freitas, P.C.D.; Barros, S.B.M. “Avaliação por análise fatorial das condições da extração do 4-nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellata* (L). Miq.” RBCF. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 41, n. 2, p. 261-269, 2005.
- Ropke, C.D.; Ostrosky, E.A.; Kaneko, T.M.; **Camilo, C.M.**; Sawada, T.C.H.; Barros, S.B.M. “Validação de metodologias analíticas para determinação quantitativa de alfa-tocoferol e 4-nerolidilcatecol.” RBCF. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, São Paulo/SP, v. 39, n. 2, p. 209-217, 2003.

Resumos em Congressos

- CAMILO, C. M. ; GOMES, S.L. . Transcriptional response of the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii* to hypoxia and transient anoxia: evidence of a regulatory mechanism similar to the mammalian HIF-1 pathway. In: FEMS - 3rd Congress of European Microbiologists, 2009, Gothenburg.
- SALINAS, R. K. ; CAMILO, C. M. ; TOMASELLI, S. ; FARAH, S. C. ; EL-DORRY, H. ; CHAMBERGO, F. S. . The Solution Structure of the C-terminal Domain of a Multiprotein Bridging Factor 1 (MBF1) of *Trichoderma reesei*. In: 49th ENC - Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, 2008, Pacific Grove, California
- CAMILO, C. M. ; EL-DORRY, H. ; GOMES, S.L. . TRANSCRIPTIONAL RESPONSE TO HYPOXIA AND TRANSIENT ANOXIA IN THE AQUATIC FUNGUS *BLASTOCLADIELLA EMERSONII*. In: 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference, 2008, Atenas.
- CAMILO, C. M. ; EL-DORRY, H. ; GOMES, S.L. . TRANSCRIPTIONAL RESPONSE OF THE AQUATIC FUNGUS *BLASTOCLADIELLA EMERSONII* TO HYPOXIA AND TRANSIENT ANOXIA. In: XXXVI Reunião Anual da SBBq e 10th IUBMB Conference, 2007, Salvador.
- SALINAS, R. K. ; CAMILO, C. M. ; FARAH, S. C. ; EL-DORRY, H. ; CHAMBERGO, F. S. . NMR STUDIES ON THE STRUCTURE OF THE C-TERMINAL DOMAIN FROM A MULTIPROTEIN BRIDGING FACTOR (TRMBF1) FROM *TRICHODERMA REESEI*. In: XXXVI Annual Meeting of the SBBq and 10th IUBMB Conference, 2007, Salvador.
- CAMILO, C. M. ; CHAMBERGO, F. S. ; EL-DORRY, H. . Cloning, heterologous expression and purification of transcription factors from *Trichoderma reesei*. In: XXXV Reunião Anual da SBBq, 2006, Águas de Lindóia.
- SALINAS, R. K. ; CAMILO, C. M. ; FARAH, S. C. ; EL-DORRY, H. ; CHAMBERGO, F. S. . NMR studies of a multiprotein bridging factor (TrMBF1) from *Trichoderma reesei* and its interaction with TATA binding protein (TrTBP). In: XXXV Reunião Anual da SBBq, 2006, Águas de Lindóia.