UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito da radiação UVB em conídios e micélios dos ascomicetos-modelo *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* e *Metarhizium anisopliae*

Érika Nascimento

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito da radiação UVB em conídios e micélios dos ascomicetos-modelo *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* e *Metarhizium anisopliae*

Érika Nascimento

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas á Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas á Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga

Ribeirão Preto
2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Nascimento, Érika
Efeito da radiação UVB em conídios e micélios dos ascomicetos-modelo *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* e *Metarhizium anisopliae.*Ribeirão Preto, 2009.
143 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.
Orientador: Braga, Gilberto Úbida Leite

1. *Aspergillus fumigatus*. 2. *Aspergillus nidulans*. 3. *Metarhizium anisopliae*. 4. Tolerância à radiação UVB. 5. T4 endonuclease V, 6. Dímeros de pirimidina ciclobutano, 7.Microarray. 8. Conidiogênese.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno Érika Nascimento
Título do trabalho Efeito da radiação UVB em conídios e micélios dos ascomicetos-modelo *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* e *Metarhizium anisopliae*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas á Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas á Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Dedico,

Aos meus amados pais, Messias e Laureluce, que sempre serão um exemplo de vida, lutaram e me incentivaram para que eu concluísse mais essa etapa na minha vida.

Aos meus queridos irmãos e cunhados, Elen, Adelson, Eber e Daniela, que sempre estiveram do meu lado em todos os momentos me dando muita força para caminhar.

Aos meus carinhosos sobrinhos, Elen, Maria Eduarda, Vinícius e Sophia, pela alegria que enche meu coração de amor.

Aos meus amáveis avós, Olívia (in memorian) e Joaquim (in memorian), Antônio e Maria (in memorian) que me deram muita luz para a minha vida e principalmente a minha avó Maria que neste ano virou uma linda estrela e sempre brilhará no meu coração.

Ao meu marido Érico, companheiro e amigo de todas as horas, só posso dizer que você me proporciona muita felicidade e sempre estarei do seu lado.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao **Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga**, além de agradecer pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório, gostaria de agradecer por você ter me dado a oportunidade de viver feliz. Pude sentir muitas alegrias nestes anos e dizer que quando a metodologia foi padronizada no laboratório fiquei realmente realizada com os estudos. Pude compreender a verdadeira paixão pela pesquisa e com certeza levarei esse sentimento por onde eu for.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo a Pesquisa do São Paulo), pela concessão da bolsa de doutorado (Processo 06/51559-4).

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Antônio Caliri** do Departamento de Física e Química, a sua contribuição foi essencial para o desenvolvimento do trabalho.

Ao **Dr. Everaldo dos Reis Marques**, meu parceiro de trabalho, um grande amigo, que sempre esteve me apoiado e me ajudando em todas as situações. Com certeza destes anos de trabalho ficaram apenas as lembranças boas e as boas risadas que demos juntos.

Aos meus amigos do laboratório **Alessandra Marques**, **Ana Luiza Calil**, **Bruno Henrique Rigoni Brarros**, **Fabrício Luiz Tulini**, **Ms**. **Gabriela Braga Rodrigues**, **Ms**. **Letícia Aparecida Schiave**, **Letícia Gonçalves Salgado**, **Ludmilla Tonani**, **Dr. Sérgio Henrique da Silva**, **Tiago Alexandre Cocio,** muito obrigada pela boa convivência e por todos os momentos maravilhosos que passamos juntos.

Aos meus colegas pós- graduandos, **Dra. Adriane da Silveira Gomes**, **Ms. Camila Henriques Coelho, Dr. Reginaldo dos Santos Pedroso**, **Ms. Renata Vilela Rodrigues, Ms. Samantha Sant Anna Marotta de Oliveira** e **Thiago Branco Hanna,** que também fizeram parte da minha vida neste período e contribuiram principalmente para que eu não perdesse meus ideais.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, **Dr. Iran Malavazi, Ms. Joel Fernandes de Lima, José Luís Capellaro, Ms. Luciano Ângelo de Souza Bernardes, Dra. Marcela Savoldi, Dra. Marcia Regina von Zeska Kress e Ms. Paula Fagundes de Gouvêa**, pela amizade e apoio em todos os momentos, vocês sempre estiveram ao meu lado nos principais momentos da minha vida.

Aos meus adoráveis tios e primos que sempre acreditaram no meu trabalho e me deram muita coragem para concluir mais essa etapa.

A minha “irmã” mais nova **Andressa Duarte Nascimento** que esteve comigo em todas as horas, obrigada pelos conselhos e alegrias que vivemos juntas.

A minha segunda família, meu sogro **Moacyr José Castro Dias**, minha sogra **Teresa Flora Marques Rodrigues Castro Dias** e meu cunhado **Marcelo Castro Dias** pelo amor, amizade e conselhos dados.

Á Deus e a Nossa Senhora das Graças que sempre iluminaram o meu caminho, colocando essas lindas pessoas na minha vida.

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina."

Cora Coralina

RESUMO

NASCIMENTO E. **Efeito da radiação UVB em conídios e micélios dos ascomicetos-modelo *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* e *Metarhizium anisopliae*.** 2009. 143f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Conídios são estruturas especializadas, produzidas assexuadamente pelo micélio de muitas espécies de ascomicetos. A produção dos conídios requer o controle espacial e temporal da expressão gênica e a formação de estruturas específicas durante o desenvolvimento. Os conídios estão envolvidos na reprodução, dispersão e persistência ambiental dos fungos. Em espécies patogênicas como *Aspergillus fumigatus* e *Metarhizium anisopliae*, os conídios também são responsáveis pela infecção do hospedeiro. Um dos principais fatores ambientais capazes de matar e / ou danificar os conídios é a radiação solar. Os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) são os principais fotoprodutos do DNA induzidos pela radiação UVB. Os principais objetivos deste trabalho foram: (1) estimar as frequências de CPDs em conídios expostos a doses subletais de radiação UVB, (2) correlacionar a frequência de CPDs com a cinética de germinação dos conídios, (3) comparar a frequência de CPDs em conídios selvagens com a frequência em conídios mutantes para a pigmentação, (4) identificar genes diferencialmente expressos durante as fases da conidiogênese de *A. fumigatus* e (5) identificar genes modulados pela radiação UVB em micélio jovem de *A. fumigatus*. Conídios de *M. anisopliae*, *A. nidulans* e *A. fumigatus* foram expostos à irradiância de 1000 mW m^{-2} de UVB por 15, 30, 60 e 90 min. As doses totais ao final das exposições foram 0,9, 1,8, 3,6 e 5,4 kJ m^{-2}. O aumento na frequência de CPDs foi linear e diretamente proporcional à dose, com 0,215, 0,455, 0,803 e 1,628 CPDs 10 kb^{-1} induzidos pelas doses de 0,9, 1,8, 3,6 e 5,4 kJ m^{-2} em *A. fumigatus*, 0,037, 0,077, 0,142 e 0,202 CPDs 10 kb^{-1} em *A. nidulans* e 0,041, 0,085, 0,155 e 0,255 CPDs 10 kb^{-1} em *M. anisopliae*. A frequência de CPDs no mutante albino de *M. anisopliae* (0,552 10 kb^{-1}) foi aproximadamente dez vezes maior do que na linhagem selvagem (0.057 10 kb^{-1}) após exposição à dose de 1,8 kJ m^{-2}. Esta é a primeira evidência direta de que a pigmentação dos conídios protege o DNA contra os danos induzidos pela radiação UVB. Microarranjos genômicos de DNA foram utilizados para comparar os transcriptomas de micélios com 20 h (início da conidiogênese), 24 h (fase intermediária) e 25 h (fase final) com o transcriptoma de micélio jovem. Foram identificados 34 genes diferencialmente expressos (7 com aumento e 27 com diminuição) com 20 h de desenvolvimento, 101 genes (12 com aumento e 89 com diminuição) com 24 h e 76 genes (oito com aumento e 68 com diminuição) com 25 h. Alguns genes que apresentaram aumento na expressão (*stuA* e o gene da *scytalone dehydratase*) já haviam sido associados com fases específicas da conidiogênese, entretanto a maioria dos genes que apresentou aumento na expressão não tem função conhecida. A análise de transcriptomas com microarranjos de DNA também foi utilizada para identificar genes com expressão modulada por exposições à radiação UVB (1,8 kJ m^{-2}) em micélio jovem de *A. fumigatus*. Foram identificados 101 genes diferencialmente expressos ao final da exposição à radiação UVB (51 genes com aumento e 50 com redução). O gene *rad*c apresentou o maior aumento na expressão (aproximadamente 16 ×). A maioria dos genes com aumento na expressão não possui função conhecida. Foram identificados 418 genes diferencialmente expressos 30 min após o termino da exposição (51 genes com aumento e 367 com redução na expressão).

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus, Aspergillus nidulans, Metarhizium anisopliae,* tolerância à radiação UVB, T4 endonuclease V, dímeros de pirimidina ciclobutano, microarray, conidiogênese.

ABSTRACT

NASCIMENTO E. **Effects of UVB radiation in conidia and mycelia of three model ascomycete fungi: *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans* e *Metarhizium anisopliae*.** 2009. 143f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Conidia are specialized structures produced asexually during mycelia growth of many ascomycete species. The process of conidiation involves temporal and spatial regulation of gene expression, cell specialization, intercellular communication, and formation of specific structures during fungal growth. Conidia are responsible for the reproduction, dispersal and environmental persistence of many fungal species. In pathogenic species like *Aspergillus fumigatus* and *Metarhizium anisopliae*, conidia are also responsible for host infection. One of the main environmental factors that can kill and/or damage conidia is solar UV radiation. Cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) are the major DNA photoproducts induced by UVB. The principal goals of the present study were to: (1) estimate the frequency of CPDs induced by sublethal doses of UVB radiation in conidial DNA of three selected ascomycetes, (2) examine correlation of CPD frequencies with germination speed, and (3) estimate the protective effect of the wild-type green conidial pigmentation on DNA in *M. anisopliae* var. *anisopliae*, (4) identify differentially expressed genes during the different phases of *A. fumigatus* conidiogenesis and (5) identify genes regulated by UVB radiation in *A. fumigatus* young mycelia. *A. fumigatus*, *A. nidulans*, and *M. anisopliae* conidia were exposed to 1000 mW m^{-2} UV irradiance for 15, 30, 60 and 90 min. Total Quaite-weighted doses were 0.9, 1.8, 3.6 and 5.4 kJ m^{-2}, respectively. The frequencies of dimers were linear and directly proportional to the doses, with 0.215, 0.455, 0.803 and 1.628 CPDs 10 kb^{-1} detected at the doses of 0.9, 1.8, 3.6 and 5.4 kJ m^{-2} in *A. fumigatus*, 0.037, 0.077, 0.142 and 0.202 CPDs 10 kb^{-1} in *A. nidulans*, and 0.041, 0.085, 0.155 and 0.255 CPDs 10 kb^{-1} in *M. anisopliae*. The frequency of dimers in the *M. anisopliae* albino mutant DWR 180 (0.552 10 kb^{-1}) was approximately ten times higher than of the wild-type ARSEF 23 strain (0.057 10 kb^{-1}) after exposure to doses of 1.8 kJ m^{-2}. DNA microarrays carrying sequence of 11,000 genes of *A. fumigatus* were used to compare transcriptomes of 20 h-old mycelia (initial phase of the conidiogenesis), 24 h (intermediate phase) e 25 h (final phase) with young mycelia transcriptome. Thirty-four genes displayed a statistically significant difference in expression (7 with increase and 27 with decrease mRNA expression) in 20 h-old mycelia, 101 genes (12 with increase and 89 with decrease) in 24 h-old mycelia and 76 genes (8 with increase and 68 with decrease) in 25 h-old mycelia. Some overexpressed genes (*stuA* ad the *scytalone dehydratase* gene) were previously related to specific phases of conidiogenesis but the function of most of them is unknown. Transcriptome analysis using microarrays was also used to identify genes modulated by exposures to UVB radiation (1,8 kJ m^{-2}) in *A. fumigatus* young mycelia. One hundred and one differentially expressed genes were identified at the end of the exposure to UVB radiation (51 genes with increase and 50 with decrease). The *rad*c gene displayed the higher increase in expression (approximately 16 ×). The function of most of the overexpressed genes is unknown. Four hundred and eighteen differentially expressed genes were identified 30 min after the end of exposure (51 genes with increase and 367 with decrease in expression).

Keywords: *Aspergillus fumigatus, Aspergillus nidulans, Metarhizium anisopliae,* UVB tolerance, T4 endonuclease V, CPDs, microarray, conidiogenesis.

RESUMEN

NASCIMENTO E. **Efecto de la radiación UVB en conidios y micelios de los ascomicetos-modelo *Aspergillus fumigatus*, *A.nidulans* y *Metarhizium anisopliae***. 2009. 143f. Tesis (Doctorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Los conidios son estructuras especializadas producidas asexuadamente por el micelio de muchas especies de ascomicetos. La producción de los conidios requiere el control espacial y temporal de la expresión génica y la formación de estructuras específicas durante su desarrollo. Los conidios están envueltos en la reproducción, dispersión y en la persistencia ambiental de los hongos. En especies patogénicas como *Aspergillus fumigatus* y *Metarhizium anisopliae*, los conidios también son los responsables por la infección del hospedero. Uno de los principales factor ambiental capaces de matar y/o dañar a los conidios es la radiación solar. Los dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) son los principales fotoproductos del ADN inducidos por la radiación UVB. Los principales objetivos de este trabajo fueron: 1) estimar las frecuencias de PCDs en conidios expuestos a dosis subletales de radiación UVB, 2) correlacionar la frecuencia de CPDs con la cinética de la germinación de los conidios; 3) comparar la frecuencia de CPDs en conidios salvajes con la frecuencia en conidios mutantes para la pigmentación; 4) identificar a los genes expresados diferencialmente durante las distintas fases de la conidiogenesis de *A.fumigatus* y 5) identificar a los genes modulados por la radiación UVB en micelio joven de *A.fumigatus*. Los conidios de *M.anisopliae*, *A.nidulans* y *A.fumigatus* han sido expuestos a la irradiancia de 1000 mW m^{-2} de UVB durante 15, 30, 60 y 90 min. Las dosis totales al final de las exposiciones fueron 0,9, 1,8, 3,6 y 5,4 kJ m^{-2}. El aumento en la frecuencia de CPDs ha sido linear y directamente proporcional a la dosis con 0,215, 0,455, 0,803 y 1,628 CPDs 10 kb^{-1} inducidos por las dosis de 0,9, 1,8, 3,6 y 5,4 kJ m^{-2} en *A.fumigatus;* 0,037, 0,077, 0,142 y 0,202 CPDs 10 kb^{-1} en *A.nidulans* y 0,041, 0,085, 0,155 y 0,255 CPDs 10 kb^{-1} en *M.anisopliae*. La frecuencia de CPDs en el mutante blanco de *M.anisopliae* (0,552 10 kb^{-1}) ha sido aproximadamente diez veces más que en la linaje salvaje (0,057 10 kb^{-1}) después de la exposición a la dosis de 1.8 kJ m^{-2}. Esta es la primera evidencia directa que la pigmentación de los conidios protege el AND contra los daños inducidos por la radiación UVB. Microarranjos genómicos de ADN fueron utilizados para comparar los transcriptomas de los micelios con 20 h (inicio de la conidiogenesis), 24h (fase intermedia) y 25 h (fase final) con el transcriptoma de micelio joven. Han sido identificados 34 genes expresados diferencialmente (7 con aumento y 27 con disminución) con 20 h de desarrollo; 101 genes (12 con aumento y 89 con disminución) con 24 h y 76 genes (8 con aumento y 68 con disminución) con 25 h. Algunos genes que presentaron aumento en la expresión (*stuA* y el gene de la *scytalone dehydratase*) ya habían sido asociados con fases específicas de la conidiogenesis, entretanto la mayoría de los genes que presentó aumento en la expresión no tienen función conocida. El análisis de transcriptomas con microarranjos de AND también ha sido utilizado para identificar genes con expresión modulada por exposiciones a la radiación UVB (1,8 kJ m^{-2}) en micelio joven de *A.fumigatus*. Fueron identificados 101 genes expresados diferencialmente al final de la exposición a la radiación UVB (51 genes con aumento y 50 con reducción). El gene *rad*c presentó el mayor aumento en la expresión (aproximadamente 16 X). La mayoría de los genes con aumento en la expresión no posee función conocida. Fueron identificados 418 genes expresados diferencialmente 30 min después del término de la exposición (51 genes con aumento y 367 con reducción en la expresión).

Palabras-llave: *Aspergillus fumigatus; Aspergillus nidulans; Metarhizium anisopliae;* tolerancia a la radiación UVB; T4 endonuclease V, dímeros de pirimidina ciclobutano; microarranjos; conidiogénesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espectro de radiação eletromagnética 7

Figura 2. Estruturas químicas dos principais fotoprodutos formados na célula após exposição à radiação UVB 10

Figura 3. Reconhecimento e quebra da cadeia de nucleotídeo adjacente ao CPD pela enzima T4 endonuclease V..... 17

Figura 4. Morfologia macroscópica e coloração das linhagens de *A. fumigatus* (CEA 17), *A. nidulans* (ATCC 10074), *M. anisopliae* var. *acridum* (ARSEF 324), *M. anisopliae* var. *anisopliae* (ARSEF 23) e do mutante albino (DWR 180) derivado da linhagem selvagem ARSEF 23..... 24

Figura 5. Irradiância espectral das lâmpadas filtradas com diacetato de celulose..... 26

Figura 6. Sistema montado dentro da câmara de exposição. Um agitador orbital (modelo TS- 2000 A tipo VDRL - Biomixer, China), 4 placas de Petri (150 × 15 mm) com as suspensões de conídios e o filme de diacetato de celulose com 0,13 mm de espessura 28

Figura 7. (A) Conídios da linhagem CEA 17 de *Aspergillus fumigatus*, (B) ATCC 10074 de *A. nidulans*, (C) ARSEF 324 de *M. anisopliae* var. *acridum*, (D) ARSEF 23 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e (E) mutante albino DWR 180 de *M. anisopliae* var. *anisopliae*..... 45

Figura 8. Germinação dos conídios de *A. fumigatus* (A), *A. nidulans* (B) e *M. anisopliae* (B) expostos à radiação UVB (1000 mW m^{-2}) por 15, 30, 60 e 90 min e de controles não expostos à radiação. A germinação foi avaliada após diferentes períodos de incubação. Cada valor é a média de três experimentos independentes e a barra mostra o desvio padrão da média..... 47

Figura 9. Germinação dos conídios da linhagem selvagem ARSEF 23 de *M. anisopliae* (A) e de seu mutante albino DWR 180, expostos à radiação UVB (1000 mW m^{-2}), por 30 min, e de controles não expostos. A germinação foi avaliada 12, 24, 36, 48 e 72 h após o final da exposição. Cada valor é a média de três experimentos independentes e a barra mostra o desvio padrão da média 48

Figura 10. (**A**) Eletroforese em gel de agarose alcalino de DNA extraído de conídios da linhagem ATCC 10074 de *Aspergillus nidulans*. Raias da esquerda para a direita: **M** = marcadores de peso molecular (λPstI); **0** = DNA não exposto e não tratado com a T4 endonuclease V antes da eletroforese; **0+T** = DNA não exposto e tratado com T4 endonuclease V; e **15**, **30**, **60**, **90** = DNAs obtidos de conídios expostos à irradiância de 1000 mWm^{-2} de UVB por 15, 30 60 e 90 minutos e tratado com T4 endonuclease V, respectivamente. (**B**) Padrões de dispersão do DNA extraído dos conídios da linhagem ATCC 10074 de *A. nidulans* expostos a diferentes doses e tratados com a T4 endonuclease V em relação aos marcadores de peso molecular. (**B1**) DNA de conídios não exposto, (**B2**) exposto por 15 min, (**B3**) exposto por 30 min, (**B4**) exposto por 60 min, (**B5**) exposto por 90 min à radiação UVB..... 49

Figura 11. (**A**) Eletroforese em gel de agarose alcalino de DNA extraído de conídios da linhagem CEA 17 de *Aspergillus fumigatus* . Raias da esquerda para a direita: **M** = marcadores de peso molecular (λPstI); **0** = DNA não exposto e não tratado com a T4 endonuclease V antes da eletroforese; **0+T** = DNA não exposto e tratado com T4 endonuclease V; e **15**, **30**, **60**, **90** = DNAs obtidos de conídios expostos à irradiância de 1000 mWm^{-2} de UVB por 15, 30 60 e 90 minutos e tratados com T4 endonuclease V, respectivamente. (**B**) Padrões de dispersão do DNA extraído dos conídios da linhagem CEA 17 de *A. fumigatus* expostos a diferentes doses e tratados com a T4 endonuclease V em relação aos marcadores de peso molecular. (**B1**) DNA de conídios não expostos, (**B2**) exposto por 15 min, (**B3**) expostos por 30 min, (**B4**) expostos por 60 min, (**B5**) expostos por 90 min à radiação UVB 50

Figura 12. (**A**) Eletroforese em gel de agarose alcalino de DNA extraído de conídios da linhagem ARSEF 324 de *Metarhizium anisopliae*. Raias da esquerda para a direita: **M** = marcadores de peso molecular (λPstI); **0** = DNA não-exposto e não tratado com a T4 endonuclease V antes da eletroforese; **0+T** = DNA não exposto e tratado com T4 endonuclease V; e **15**, **30**, **60**, **90** = DNAs obtidos de conídios expostos à irradiância de 1000 mWm^{-2} de UVB por 15, 30 60 e 90 minutos e tratado com T4 endonuclease V, respectivamente. (**B**) Padrões de dispersão do DNA extraído dos conídios da linhagem ARSEF 324 de *M. anisopliae* expostos a diferentes doses e tratados com a T4 endonuclease V em relação aos marcadores de peso molecular. (**B1**) DNA de conídios não expostos, (**B2**) expostos por 15 min, (**B3**) expostos por 30 min, (**B4**) expostos por 60 min, (**B5**) expostos por 90 min à radiação UVB 51

Figura 13. Frequência de dímeros de pirimidina do tipo ciclobutano (CPDs 10 kb^{-1}) nos DNAs de conídios de *A. nidulans* (ATCC 10074), *M. anisopliae* var. *acridum* (ARSEF 324) e *A. fumigatus* (CEA 17) após exposições à irradiância de 1000 mW m^{-2} de UVB por 15, 30, 60 e 90 min. As barras de erro são os desvios padrões de três experimentos independentes 52

Figura 14. (**A**) Eletroforeses em geís de agarose alcalinos de DNA extraído de conídios das linhagens ARSEF 23 (selvagem) e DWR 180 (mutante albino) de *Metarhizium anisopliae* (esquerda para a direita). Raias da esquerda para a direita: **M** = marcadores de peso molecular (λPstI); **0** = DNA não exposto e não tratado com a T4 endonuclease V antes da eletroforese; **0+T** = DNA não exposto e tratado com T4 endonuclease V; e **30** = DNA obtido de conídios expostos à irradiância de 1000 mWm^{-2} de UVB por 30 minutos e tratado com T4 endonuclease V. (**B**) Padrões de dispersão do DNA extraído dos conídios das linhagens ARSEF 23 e DWR 180 de *M. anisopliae* (esquerda para a direita), expostos a diferentes doses e tratados com a T4 endonuclease V em relação aos marcadores de peso molecular. (**B1**) DNA de conídios não expostos, (**B2**) expostos por 30 min à radiação UVB 57

Figura 15. Frequência de dímeros de pirimidina do tipo ciclobutano (CPDs 10 kb^{-1}) em DNA de conídios da linhagem selvagem ARSEF 23 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e no seu mutante albino DWR 180 após exposições à irradiância de 1000 mW m^{-2} de UVB por 0 e 30 min. As barras de erro são os desvios padrões de três experimentos independentes 57

Figura 16. Macromorfologia das fases da conidiogênese de *Aspergillus fumigatus* durante o desenvolvimento do fungo em PDAY a 28 °C. (A) micélio jovem com 16 h mostrando a distribuição uniforme do inóculo de coloração branca, indicando a ausência de conídio, (B) micélio com 20 h mostrando o desenvolvimento uniforme e um leve esverdeado, (C) micélio com 24 h mostrando a intensificação do esverdeado de forma uniforme, (D) micélio com 25 h de desenvolvimento com o completo esverdeamento da placa e uma distribuição homogênea, tendo completado o processo de conidiogênese 59

Figura 17. Micrografia mostrando a formação das principais estruturas envolvidas na conidiogênese de *Aspergillus fumigatus* durante o desenvolvimento do fungo. (A) conídios não germinados (0 h de desenvolvimento), (B) micélio jovem com 16 h, (C) micélio com 20 h, mostrando o início da formação da vesícula dos conidióforos, (D) micélio com 24 h, apresentando conidióforos com fiálides e (E) micélio com 25 h, apresentando conidióforos completamente formados e conídios abundantes. Coloração lactofenol azul - algodão..... 60

Figura 18. Delineamento experimental das hibridações de *microarray* a partir do tempo de desenvolvimento do *Aspergillus fumigatus*. As hibridações foram realizadas para cada fase da conidiogênese e consistiram de um par de hibridações que combinava um par de RNA de referência marcado com o Cy3 (16 h) ao RNA teste marcado com o Cy5 (20, 24 e 25 h) e por uma segunda hidridação *dye swap*..... 61

Figura 19. Representação gráfica dos genes modulados nas fases da conídiogênese de *Aspergillus fumigatus*. (**A**) 1. 902 genes expressos e (**B**) 875 genes reprimidos 62

Figura 20. Perfil de expressão dos genes *aba1*, *adh*, *arp1*, *brt1*, *cat2*, proteína hipotética, proteína hipotética conservada e *stuA* durante as fases da conidiogênese de *Aspergillus fumigatus* avaliado por RT PCR em tempo real. Os valores representam o número de vezes que o gene foi expresso em comparação ao micélio jovem (16 h de desenvolvimento) 67

Figura 21. Delineamento experimental das hibridações de *microarray* a partir de exposições subletais à radiação UVB em micélio de Aspergillus fumigatus. As hibridações foram realizadas com o micélio exposto à radiação UVB por 30 min e após 30 min de recuperação no escuro. Estas condições consistiram de um par de hibridações que combinava um par de RNA de referência marcado com o Cy3 (micélio não exposto) ao RNA teste marcado com o Cy5 (micélio exposto e recuperado) e por uma segunda hidridação *dye swap*..... 72

Figura 22. Representação gráfica dos genes modulados por exposições subletais à radiação UVB em micélio de *Aspergillus fumigatus*. (**A**) 1. 363 genes expressos e (**B**) 1.134 genes reprimidos 73

Figura 23. Perfil de expressão dos genes *cat2*, *cdc25*, *hsp30* e *radC* durante exposições subletais à radiação UVB e após 30 min de recuperação no escuro em micélio de *Aspergillus fumigatus* avaliado por RT PCR em tempo real. Os valores representam o número de vezes que o gene foi expresso em comparação com o micélio vegetativo 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos pares de *primers* e sondas fluorescentes utilizados nas reações de RT-PCR em Tempo Real para a validação dos experimentos com os *microarrays* das fases da conidiogênese em *A. fumigatus* 40

Tabela 2. Descrição dos pares de *primers* e sondas fluorescentes utilizados nas reações de RT-PCR em Tempo Real, para a validação dos experimentos com os *microarrays* 43

Tabela 3. Genes mais significativamente expressos de *Aspergillus fumigatus*, com 20 h de desenvolvimento (início da conidiogênese), em relação ao micélio jovem, com 16 h de desenvolvimento 63

Tabela 4. Genes mais significativamente expressos de *Aspergillus fumigatus*, com 24 h de desenvolvimento (fase intermediária da conidiogênese), em relação ao micélio jovem, com 16 h de desenvolvimento 64

Tabela 5. Genes mais significativamente expressos de *Aspergillus fumigatus*, com 25 h de desenvolvimento (final da conidiogênese), em relação ao micélio jovem, com 16 h de desenvolvimento 66

Tabela 6. Genes mais significativamente expressos de *Aspergillus fumigatus*, exposto à radiação UVB (1000 mW m^{-2}) por 30 min 74

Tabela 7. Genes mais significativamente expressos de *Aspergillus fumigatus*, após 30 min de recuperação no escuro, depois da exposição à radiação UV por 30 min 75

LISTA DE ABREViATURAS E SIGLAS

$A_{260\ nm}$	Absorbância em 260 nm
$A_{280\ nm}$	Absorbância em 280 nm
ARSEF	ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures
ATCC	American Type Culture Collection
cDNA	DNA complementar
cm	Centímetro
CPD	Dímeros de Pirimidina Ciclobutano (Cyclobutane pyrimidine dimmers)
Cy3	Cyanine3
Cy5	Cyanine5
DNA	Ácido desoxiribonucléico (Desoxyribonucleic acid)
DO	Densidade ótica
DWR	Donald W. Roberts
et al	e outros (Expressão latina)
g	Gravidade
g	Grama
$g\ L^{-1}$	Gramas por litro
h	Hora
k	Constante
Kb	Kilo base
KDa	Quilodalton
KJ	Quilojaule
$KJ\ m^{-2}$	Quilojaule por metro quadrado
KW	Quilowatts
L	Litro
M	Molar
m/v	Massa por volume
m^2	Metro quadrado
MEV	Multi Experiment Viewer
$mg\ ml^{-1}$	Miligrama por mililitro
min	Minuto

mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mV	Milivolts
mW	Miliwatt
mW cm^{-2}	Miliwatts por centímetros quadrados
mW m^{-2}	Miliwatt por metro quadrado
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
P	Probabilidade
p/v	Peso por volume
PBS	Salina fosfato tamponada (Phosphate buffered saline)
PDA	Ágar Batata (Potato Dextrose Agar)
PDAY	Ágar Batata com Extrato de Levedura (Potato Dextrose Agar with Yeast Extract)
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol/µl	Picomol por microlitro
RNA	Ácido ribonucléico (Ribonucleic Acid)
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RNAr	Ácido ribonucléico ribossômico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotações por minuto
s	Segundos
SOP	Standard Operational Procedures
U	Unidade
U/ µl	Unidade por microlitro
UV	Ultra Violeta
UVA	Ultra Violeta A (320-400 nm)
UVB	Ultra Violeta B (280-320 nm)
UVC	Ultra Violeta C (100-280 nm)
V	Volts
V cm^{-2}	Volts por centímetro quadrado
v/v	Volume por volume
W	Watts

W m-2	Watts por metro quadrado
Φ	Frequência (*Fi*, 21ª letra do alfabeto grego)
µm	Micrometro
%	Porcentagem
×	Vezes
°C	Graus Celsius
µg mL-1	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro

SUMÁRIO

RESUMO i

ABSTRACT ii

RESUMEN iii

LISTA DE FIGURAS iv

LISTA DE TABELAS viii

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ix

1 - INTRODUÇÃO 2

1.1 - Os ascomicetos-modelo *Aspergillus fumigatus, Aspergillus nidulans* e *Metarhizium anisopliae* 2

1.2 - Conídios e Conidiogênese 4

1.3 - A radiação ultravioleta 6

1.4 - Efeitos biológicos das radiações UVA e UVB 8

1.5 - A proteção celular contra os danos induzidos pela radiação UV 11

1.6 - Fotobiologia e fotoquímica de conídios 14

1.7 - A quantificação de danos no DNA induzidos pela radiação UV 16

1.8 - Genômica, análise da expressão gênica em larga escala e *microarray*s de DNA 19

2 - OBJETIVOS 22

3 - MATERIAIS E MÉTODOS 24

3.1 - Efeitos da radiação UVB em conídios de *A. fumigatus*, *A. nidulans* e *M. anisopliae* var. *anisopliae e* var. *acridum* 24

3.1.1 - Espécies e linhagens utilizadas 24

3.1.2 - Obtenção de conídios 25

3.1.3 - Determinação das dimensões dos conídios 25

3.1.4 - Câmara de exposição, lâmpadas e filtro 26

3.1.5 - Preparo das suspensões de conídios para as exposições 27

3.1.6 - Exposições dos conídios à radiação UVB 27

3.1.7 - Determinação do efeito da radiação UVB na germinação dos conídios 29

3.1.8 - Análises estatíticas do efeito da radiação UVB na germinação dos conídios 29

3.1.9 - Quantificação de dímeros de pirimidina do tipo ciclobutano em conídios 30

3.1.9.1 - Extração, purificação e quantificação do DNA genômico 30

3.1.9.2 - Digestão do DNA com a enzima T4 endonuclease V 32
3.1.9.3 - Eletroforese quantitativa em gel de agarose alcalino 33
3.1.9.4 - Determinação da frequência dos dímeros de pirimidina do tipo ciclobutano 33
3.2 - IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DURANTE AS FASES DA CONIDIOGÊNESE DE A*. FUMIGATUS* **..... 34**
3.2.1 - Linhagem de *A. fumigatus* 34
3.2.2 - Produção de conídios e preparação do inóculo 35
3.2.3 - Obtenção de micélio ao longo do desenvolvimento em meio PDAY 35
3.2.4 - Extração de RNA 35
3.2.5 - Síntese e marcação fluorescente dos cDNAs, hibridação e escaneamento dos *microarray*s 36
3.2.6 - Análise das imagens 37
3.2.7 - Análise estatística 37
3.2.8 - Validação do *microarray* das fases da conidiogênese de *A. fumigatus* por *Real-time RT-PCR* 38
3.3 - Identificação de genes modulados por exposições sub-letais à radiação UVB em micélio jovem de *A. fumigatus* 40
3.3.1 - Linhagem de *A. fumigatus* 40
3.3.2 - Produção de conídios e preparação do inóculo 40
3.3.3 - Obtenção de micélio e exposição à radiação UV 41
3.3.4 - Extração de RNA, marcação, hibridação e análise dos *microarray*s de *A. fumigatus* 41
3.3.5 - Validação do *microarray* da exposição subletal à radiação UVB de *A. fumigatus* por *Real-time RT-PCR* 41
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
4.1 - Efeitos da radiação UVB em conídios de *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *M. anisopliae* var. *anisopliae e M. anisopliae* var. *acridum* 45
4.1.1 - Dimensão dos conídios 45
4.1.2 - Efeito da radiação UVB na germinação dos conídios 46
4.1.3 - Quantificação dos CPDs induzidos pela radiação UVB nos conídios da linhagem CEA 17 de *A. fumigatus*, ATCC 10074 de *A. nidulans* e ARSEF 324 de *M. anisopliae* var. *acridum* 48
4.1.4 - Efeito protetor da pigmentação contra a indução de CPDs em conídios de *M. anisopliae* var. *anisopliae* 56
4.2 - IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DURANTE AS FASES DA CONIDIOGÊNESE DE A*SPERGILLUS FUMIGATUS* **.... 59**
4.2.1 - Desenvolvimento macroscópico e microscópico do fungo 59

4.2.2 - Utilização da técnica de *microarray* para a identificação de genes diferencialmente expressos durante as fases da conidiogênese de *Aspergillus fumigatus* 61

4.2.2.1 - Genes diferencialmente expressos durante a fase inicial da conidiogênese de *Aspergillus fumigatus* 62

4.2.2.2 - Genes diferencialmente expressos durante a fase intermediária da conidiogênese de *Aspergillus fumigatus* 64

4.2.2.3 - Genes diferencialmente expressos durante a fase tardia da conidiogênese de *Aspergillus fumigatus* 65

4.2.3 - Validação da expressão de genes expressos identificados no *microarray* de conidiogênese por RT-PCR em tempo real. 67

4.3 - Identificação de genes modulados por exposições subletais à radiação UVB em micélio de *A. fumigatus* 72

4.3.1 - Utilização da técnica de *microarray* para a identificação de genes modulados por exposições subletais à radiação UVB em micélio de *A. fumigatus* ... 72

4.3.1.1 - Genes diferencialmente modulados no micélio jovem de *Aspergillus fumigatus*, exposto à radiação UVB 74

4.3.1.2 - Genes diferencialmente modulados no micélio jovem de *Aspergillus fumigatus*, recuperado no escuro após exposição à radiação UVB 75

4.3.2 - Validação da expressão de genes expressos identificados no *microarray* por *Real-time RT-PCR* 76

5 - CONCLUSÕES 81

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 83

APÊNDICES 100

1 - Introdução

1 - INTRODUÇÃO

1.1- Os ascomicetos-modelo *Aspergillus fumigatus, Aspergillus nidulans* e *Metarhizium anisopliae*

O *Aspergillus fumigatus* é um fungo saprófita e patógeno opotunista com ampla distribuição geográfica. O fungo possui conídios esféricos pequenos (2 - 3,5 µm de diâmetro) que pemanecem suspensos na atmosfera por longos períodos, facilitando as suas dispersões pelo ar (MOWAT et al., 2009). *A. fumigatus* causa a maioria das aspergiloses em humanos, que é a infecção fúngica mais comum em pacientes hospitalizados depois das micoses causadas por *Candida albicans.* O fungo causa micoses como a aspergilose bronco-pulmonar alérgica, o aspergiloma (bola fúngica) e a aspergilose invasiva (sistêmica), principalmente em pacientes imunocomprometidos (MOWAT et al., 2009; LATGÉ, 1999). A aspergilose possui uma mortalidade de 30-90% (MOWAT et al., 2009; LATGÉ, 1999) e é causada pela inalação dos conídios. Após o desenvolvimento do fungo nos pulmões, a infecção dissemina-se para os outros orgãos do corpo (STEINBACH et al., 2003). A principal razão da morte dos pacientes é a baixa eficiência das drogas disponíveis para o tratamento. A importância clínica crescente aumentou muito o interesse pelo estudo de diversos apectos da biologia de *A. fumigatus* (LI et al., 2007).

O saprófita *A. nidulans* tem sido um dos principais sistemas-modelo em genética e biologia molecular nos últimos 50 anos e o seu estudo contribuiu muito para a melhor compreensão de diversos processos celulares importantes, como mitose, expressão gênica e desenvolvimento. O gênero *Aspergillus* também tem contribuido para o entendimento do metabolismo secundário em fungos e para o estudo de metabólitos secundários economicamente importantes, como as

aflatoxinas e penicilinas (BENNETT, 2009; CALVO et al., 2002; YU, KELLER, 2005). *A. nidulans* é normalmente isolado do solo e também pode ocorrer como bolor em alimentos (LACAZ et al., 2002; MALAVAZI, 2007; WARD, 1991; ADAMS; WIESER; YU, 1998). Algumas espécies do gênero *Aspergillus*, como *A. nidulans*, possuem reprodução assexuada e reprodução sexuada conhecida, mas, na maioria das espécies, a reprodução sexuada ainda é desconhecida (BENNETT, 2009; MALAVAZI, 2007). O sequenciamento completo dos genomas de *A. nidulans* e de *A. fumigatus*, em 2005, permitiu a construção de *microarrays* genômicos de DNA que têm sido utilizados amplamente para o estudo de seus transcriptomas (GALAGAN et al., 2005; NIERMAN et al., 2005).

O deuteromiceto entomopatogênico *M. anisopliae* é considerado uma alternativa interessante aos inseticidas químicos em programas para o controle de vetores de doenças e de pragas agrícolas em diversos países. Além do ciclo patogênico, o fungo vive como saprófita e pode ser facilmente isolado de amostras de solos (BRAGA et al., 2001a,b; ROBERTS; ST. LEGER, 2004). O principal fator ambiental que compromete a eficácia do fungo como bioinseticida é a radiação solar. A exposição direta, por poucas horas, à radiação solar pode inativar completamente o conídio de *M. anisopliae*, que é o estágio do fungo normalmente utilizado como inóculo no campo (BRAGA et al., 2001c). Em adição à inativação de grande parte do inóculo, os conídios sobreviventes usualmente apresentam alterações genéticas e/ou fisiológicas que reduzem a sua virulência (BRAGA et al., 2001a,b). *M. anisopliae* foi escolhido para este estudo por ser um fungo que apresenta interesse comercial e pelo fato de diversos aspectos de sua fotobiologia terem sido intensamente estudados nos últimos anos (BRAGA et al., 2001a,b,c,d; BRAGA et al.,

2002a,b; Miller et al., 2004; RANGEL et al., 2004; RANGEL et al., 2005; BRAGA et al., 2006).

Neste trabalho, foram utilizados, algumas vezes em paralelo, os três modelos biológicos (*A. nidulans*, *A. fumigatus* e *M. anisopliae*) para facilitar o entendimento dos mecanismos envolvidos na proteção e na resposta celular à radiação solar em fungos.

1.2 - Conídios e Conidiogênese

Conídios são estruturas de reprodução produzidas assexuadamente por ascomicetos e deuteromicetos. Os conídios estão envolvidos na dispersão e na persistência ambiental dos fungos. Em espécies patogênicas, como *A. fumigatus* e *A. nidulans*, os conídios também são responsáveis pelo reconhecimento do hospedeiro e início da infecção.

A conidiogênese, que é o processo responsável pela produção de conídios, envolve interações morfológicas e fisiológicas complexas, incluindo a regulação temporal e espacial da expressão gênica, a especialização celular e a comunicação intracelular (LACAZ et al., 2004; ADAMS; WUESER; YU, 1998). Os mecanismos genéticos que controlam a produção de conídios foram descritos com detalhes em *A. nidulans* (ADAMS; WUESER; YU, 1998). O ciclo reprodutivo assexual do *A. nidulans* pode ser dividido em pelo menos três diferentes fases: (1) a fase de crescimento, que se inicia após as induções de sinais; (2) a fase de desenvolvimento e (3) a fase de regulação do desenvolvimento. A conidiogênese é regulada por três genes principais em *A. nidulans*, os genes *brlA* e *abaA* são responsáveis pela formação do conídios e o gene *wetA*, que é expresso mais tardiamente no desenvolvimento, está associado com à síntese de componentes cruciais da parede celular (ADAMS;

WUESER; YU, 1998, STRINGER et al., 2008). Dois outros genes são importantes para o controle do desenvolvimento em *A. nidulans stuA* e *medA*, que estão envolvidos na determinação de padrões espaciais no conidióforo multicelular. Mutações nos 5 genes citados anteriormente provocam uma instabilidade celular e/ou a esterilidade do organismo (ADAMS; WUESER; YU, 1998). Em *Penicillium marneffei*, os genes *abaA* e *stuA* são expressos somente durante a conidiogênese e codificam a sub-unidade da proteína Gα (VANITTANAKOM et al., 2006). Em *Fusarium oxysporum*, os genes *rem1* e *FoSTUA* (similar ao *stuA* de *A. nidulans*) codificam reguladores transcricionais essenciais para a conidiogênese (IIDA; OHARA; TSUGE, 2006).

Uma importante etapa da conidiogênese é a produção de pigmentos, que têm sido associados com a tolerância dos conídios a diversos fatores geradores de estresse, incluindo a radiação solar (BRAGA et al., 2006). Conídios de linhagens selvagens de *A. nidulans* normalmente apresentam pigmentação verde escura. Dois genes, *wA* e *yA*, são centrais para a pigmentação dos conídios. Mutantes para esses genes permitiram a identificação e caracterização de outros genes envolvidos na síntese de pigmentos. Esses genes também são excelentes marcadores para o estudo de fases específicas do desenvolvimento do fungo, como a conidiogênese. Outros genes, como *ygA* e *yB*, também estão envolvidos na biossíntese e pigmentos. Mutantes para esses genes apresentam conídios amarelos (ADAMS; WUESER; YU, 1998). Os genes *ivoA* e *ivoB*, quando mutados, clareiam a coloração dos conídios e seus produtos estão envolvidos na síntese de melaninas (ADAMS; WUESER; YU, 1998). Três genes, *alb1*, *arp1* e *arp2* estão envolvidos na biossíntese de pigmentos de conídios em *A. fumigatus* (LATGÉ, 1999). O gene *alb1* codifica a proteína “polyketide synthase”, o gene *arp1* codifica uma provável “scytalone

dehydratase" e o gene *arp2* codifica a "NH reductase". A presença desses 3 genes sugere a existência de uma via de biossíntese de melanina (TSAI et al., 1999).

Outros genes, como *rodA* e *dewA*, em *A. nidulans*, também são regulados durante o desenvolvimento dos conidióforos e estão envolvidos na síntese de componentes específicos da parede celular, como as hidrofobinas. Hidrofobinas são proteínas afipáticas que fazem parte da parede de hifas aéreas e dos conídios. Essas proteínas apresentam diversas funções biológicas e são fatores importantes na determinação das características físico-químicas da superfície dos conídios (ADAMS; WUESER; YU, 1998; STRINGER et al., 2008).

1.3 - A radiação ultravioleta

A fração ultravioleta (UV) do espectro é apontada como um dos principais fatores responsáveis pelo controle de populações naturais de fungos e de bactérias. A radiação UV é capaz de reduzir o inóculo de patógenos importantes e de limitar sua dispersão no ambiente (ROTEM et al., 1985; WILLOCQUET et al., 1996; PAUL et al., 1997; PARNELL et al., 1998). Por outro lado, seus efeitos deletérios são capazes de inviabilizar, em muitas situações, a utilização de microrganismos para o controle biológico de vetores de doenças e de insetos-praga (GARDNER et al., 1977; ZIMMERMANN, 1982; MOORE et al., 1993; FARGUES et al., 1997; BRAGA et al., 2001a,b,c,d; BRAGA et al., 2002a,b). O espectro ultravioleta é convencionalmente dividido em três intervalos de comprimentos de onda: UVA (400 a 320 nm), UVB (320 a 280 nm) e UVC (280 a 100 nm) (Figura 1).

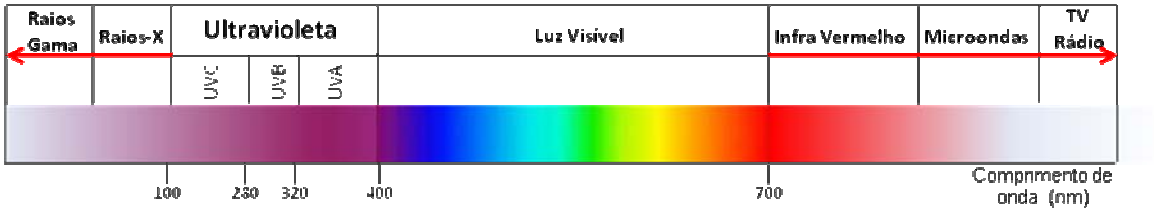

Figura 1. Espectro de radiação eletromagnética.

A UVC é a fração predominante em lâmpadas germicidas. A fração UV do espectro solar que atinge a superfície da Terra é composta exclusivamente por UVA e por UVB, já que o ozônio atmosférico reduz drasticamente a penetração de radiações com comprimentos de onda menores do que 320 nm e impede a penetração de radiações com comprimentos de onda menores do que 290 nm. Uma das consequências da redução da camada de ozônio é o aumento da incidência de radiação UVB, principalmente com comprimentos de onda entre 290 e 320 nm (KIRCHHOFF et al., 1996; MALDRONICH et al., 1998; CALDWELL; FLINT, 1997; CALDWELL et al., 1998; MCKENZIE et al., 1999). Em termos quantitativos, cerca de 95% da energia total do espectro UV que atinge a superfície do planeta é devido à UVA, sendo a UVB responsável por 5% da energia restante (FREDERICK; ALBERTS, 1991). Quanto à ação biológica, essa proporção é drasticamente alterada, pois a radiação UVB é muito mais efetiva do que a radiação UVA. A maior efetividade biológica da radiação UVB tem sido demonstrada pelos espectros de ação desenvolvidos para diversos sistemas biológicos (PEAK; PEAK, 1983; MUNAKATA et al., 1996; QUAITE et al., 1992; TYRRELL, 1995; PAUL et al., 1997; BRAGA et al., 2001c). Embora os efeitos da radiação UV em fungos sejam estudados há décadas, grande parte desses estudos foi realizada com a radiação UVC (CHELICO et al., 2005; SLIEMAN; NICHOLSON, 2000). Como esse tipo de

radiação não apresenta relevância ambiental, a extrapolação dos resultados para situações reais fica comprometida (BRAGA et al., 2006). A utilização de distribuições espectrais que se aproximam das apresentadas pela radiação solar na determinação dos efeitos fisiológicos e moleculares da radiação UV é mais recente (BRAGA et al., 2001c; BRAGA et al., 2002a,b; RANGEL et al., 2004; RANGEL et al., 2005, BRAGA et al., 2006). A complexidade do espectro solar, a multiplicidade dos efeitos das diferentes frações espectrais e as diversas interações entre elas fazem com que o efeito da exposição à radiação nas células seja extremamente complexo (MOORE et al., 1993; MORLEY-DAVIS et al., 1995; RASANAYAGAM et al., 1995; GUNASEKERA et al., 1997; BENDER et al., 1997; PETIN et al., 1997; GRIFFITHS et al., 1998; MUELA et al., 2000).

1.4 - Efeitos biológicos das radiações UVA e UVB

A UVB e a UVA exercem seus efeitos citotóxicos de maneiras distintas. Enquanto a UVB é absorvida diretamente por ácidos nucléicos, lipídios e proteínas, o que leva à formação de vários tipos de fotoprodutos que comprometem a estrutura e a função dessas macromoléculas, a UVA exerce a sua toxicidade principalmente de maneira indireta, através de intermediários, como os radicais fotossensibilizadores, ou através de formas reativas de oxigênio (ROS) (FRIEDBERG et al., 1995; GRIFFITHS et al., 1998).

Os efeitos citotóxicos da UVA foram estabelecidos a partir de experimentos realizados em diversos sistemas biológicos (PEAK et al., 1991; FRIEDBERG et al., 1995; GRIFFITHS et al., 1998; BRAGA et al., 2001c). Embora a absorção direta da UVA pelo DNA seja baixa, esse tipo de radiação é fortemente absorvido por outros cromóforos intracelulares, conhecidos como fotossensibilizadores endógenos. Nas

células de mamíferos, os principais cromóforos endógenos são a riboflavina, as porfirinas, as quinonas e as formas reduzidas dos co-fatores da nicotinamida (GRIFFITHS et al., 1998). A energia absorvida é diretamente transferida para o DNA, proteínas e lipídios pelos cromóforos excitados (reações de fotossensibilização do tipo I) ou pelas formas reativas de oxigênio (ROS) (reações do tipo II), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o superóxido (O_2^-), a hidroxila (OH) e o oxigênio singlete ($^1O_2$) (FOOTE, 1991). Ambos os processos são dependentes do oxigênio. Essas transferências de energia são conhecidas como fotossensibilização. As três lesões mais comuns nas bases nitrogenadas induzidas pela UVA são: (1) 8-hidroxideoxiguanina, (2) hidroxiidroperóxidos e (3) fotoprodutos de pirimidinas (PEAK et al., 1991; FRIEDBERG et al., 1995; GRIFFITHS et al., 1998). Além de causar alterações nas bases, a UVA é capaz de provocar quebras simples e duplas no DNA. Os danos no DNA provocados pelas ROS induzidas pela UVA são idênticos aos danos provocados pelas ROS geradas por outras fontes endógenas, o que dificulta a individualização dos efeitos da UVA em sistemas celulares. Além de provocarem alterações no DNA, os radicais livres induzidos pela UVA são capazes de danificar todas as estruturas celulares conhecidas. O comprometimento das funções das membranas celulares devido à peroxidação de lipídios e à desnaturação de proteínas envolvidas no transporte trans-membrana foi observado em diversos sistemas celulares (ARAMI et al., 1997; PIVA et al., 1998).

O DNA é um dos principais cromóforos para a radiação UVB. A absorção desse tipo de fóton pelas bases nitrogenadas causa a excitação de elétrons que migram para níveis de energia superiores e menos instáveis. Essas formas intermediárias das bases nitrogenadas altamente reativas podem sofrer degradação ou reagir rapidamente com outras biomoléculas. Diversos fotoprodutos, como: (1)

dímeros de pirimidinas do tipo ciclobutano, (2) dímeros de pirimidina (6-4) pirimidona, (3) isômero Dewar, (4) hidratos de pirimidina e (5) glicóis de timina podem formar-se como conseqüência da absorção da UVB pelas bases nitrogenadas (CLINGEN et al., 1995; PFEIFER, 1997; GRIFFITHS et al., 1998; CADET et al., 2005; CHELICO et al., 2005) (Figura 2).

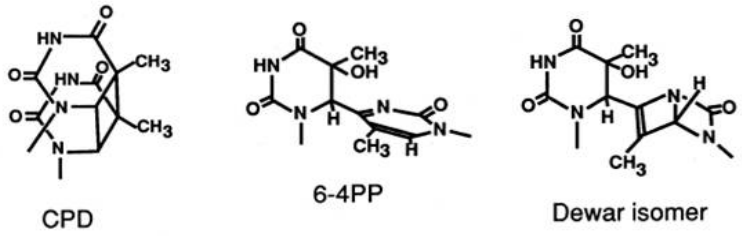

Figura 2. Estruturas químicas dos principais fotoprodutos formados na célula após exposição à radiação UVB. Figura extraída e modificado de Kobayashi et al. (2001).

Os dímeros de pirimidina são as lesões mais comuns induzidas pela radiação UVB no DNA (AHMED; SETLOW 1993; YOU et al., 2001; HOLLÓSY, 2002; PFEIFER et al., 2005). Além de alterações nas bases, a UVB também provoca um número limitado de quebras nas cadeias do DNA (CLINGEN et al., 1995; FRIEDBERG et al., 1995; GRIFFITHS et al., 1998).

A UVB também é fortemente absorvida por aminoácidos aromáticos, como a tirosina, o triptofano e a fenilalanina (GERHARDT et al., 1999; HOLLÓSY, 2002). As formas reativas dos resíduos desses aminoácidos podem sofrer autólise ou reagir com outras moléculas. Em ambos os casos, podem ocorrer a desnaturação e a perda da função biológica de enzimas e de proteínas (GERHARDT et al., 1999; HOLLÓSY, 2002). O fato de o DNA estar intimamente associado a proteínas torna

comum a ocorrência de ligações cruzadas entre essas moléculas após as exposições à radiação UVB (FRIEDBERG et al., 1995; GRIFFITHS et al., 1998).

1.5 - A proteção celular contra os danos induzidos pela radiação UV

Grande parte dos microrganismos é exposta à radiação solar durante parte ou durante todo o seu ciclo de vida (BIDOCHKA et al., 2001; BRAGA et al., 2001 a,b,c,d; BRAGA et al., 2002a,b; BRAGA et al., 2006). Os efeitos deletérios da radiação UV levaram ao desenvolvimento de uma série de sistemas de proteção e de reparo cuja função básica é manter a integridade do material genético e dos componentes celulares essenciais à vida. A base genética da tolerância celular à radiação é multifatorial e complexa, podendo envolver (1) pigmentos localizados na superfície, que são capazes de bloquear a entrada da radiação no interior da célula (BHARTI; KHURANA, 1997; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003; BRAGA et al., 2006); (2) proteínas e enzimas capazes de proteger as macromoléculas e os componentes celulares contra os efeitos danosos da radiação (NICHOLSON et al., 2000); (3) sistemas enzimáticos complexos, capazes de reparar os danos provocados pela radiação (TRAUTINGER et al., 1996; GRIFFITHS et al., 1998; GOLDMAN et al., 2002), e (4) enzimas capazes de inativar as substâncias tóxicas induzidas pela radiação (GRIFFITHS et al., 1998; MILLER et al., 2004). Devido à sua importância evolutiva, diversos mecanismos envolvidos na tolerância celular à radiação UV foram extremamente conservados (ENGELBERG et al., 1994).

O repertório de antioxidantes utilizado pelas células no combate ao estresse oxidativo inclui enzimas que catalisam a remoção de radicais específicos (catalases, peroxidases, superóxido dismutases, glutationa redutase) e peptídios de baixo peso molecular, com capacidade inespecífica de remoção de agentes oxidantes

(glutationa, ascorbato) (GRIFFITHS et al., 1998). A função fotoprotetora dos carotenóides que atuam na remoção do oxigênio singlete tem sido descrita em diversos sistemas celulares (GEIS; SZANISZLO, 1984; BARTLEY et al., 1990). De maneira geral, a importância dos antioxidantes endógenos para a tolerância à radiação UV continua controversa, devido à grande variação observada entre os resultados obtidos nos vários sistemas biológicos avaliados.

Lesões no DNA comprometem processos importantes, como a duplicação e a transcrição, e podem ocasionar a morte celular se não forem reparadas (RICH et al., 2000). Os danos no material genético induzem um conjunto de respostas capaz de facilitar o reparo do DNA. Dentre essas respostas, estão a interrupção temporária do ciclo celular (ELLEDGE, 1996; LONGHESE et al., 1998; ZHOU; ELLEDGE, 2000), a redução da velocidade de duplicação do DNA (PETIT-FRÈRE et al., 1996; RICH et al., 2000) e o aumento na transcrição de alguns genes envolvidos na duplicação e no reparo do DNA (BENDER et al., 1997; PAULOVICH et al., 1998; KUSEWITT et al., 1998; SESTO et al., 2002; KUANG-YU; CHEUNG, 2003). Esses mecanismos, extremamente conservados, são importantes para a estabilidade do genoma, já que a maioria das mutações induzidas pela UV surge devido à incorporação errada de nucleotídeos durante a duplicação semiconservativa de trechos lesionados do DNA (FRIEDBERG et al., 1995; GARFINKEL; BAILIS, 2002).

De maneira geral, as lesões no DNA são removidas por, pelo menos, cinco sistemas principais, que podem se sobrepor parcialmente: (1) reversão direta, (2) excisão de base (BER), (3) excisão de nucleotídeo (NER), (4) recombinação homóloga e (5) junção de extremidades (FRIEDBERG et al., 1995; PFEIFER 1997; HOEIJMAKERS, 2001).

A reversão direta de danos provocados pela radiação UV, como os dímeros de pirimidina, é normalmente realizada por fotoliases, que são enzimas ativadas por comprimentos de onda entre 300 e 600 nm. Essas enzimas, amplamente distribuídas, mas não universais, foram detectadas em *S. cerevisiae* (SANCAR, 1994) e em diversos gêneros de fungos filamentosos, como *Neurospora* (EKER et al., 1994) e *Trichoderma* (SAMETZ-BARON, 1997; BERROCAL-TITO, 2000). A transcrição do gene para fotoliase (*PHR1*) em *S. cerevisiae* é aumentada quando a célula é exposta à radiação UV e a diversos agentes químicos capazes de interagir com o DNA. Não foram observados níveis significativos de fotorreativação nos fungos *Verticillium lecanii*, *Aphanocladium album* e *M. anisopliae*, o que indica que a fotorreativação, caso ocorra, tem importância limitada na remoção dos danos induzidos pela radiação UVB nessas espécies de entomopatógenos (BRAGA et al., 2002a).

A remoção de bases modificadas ou danificadas é iniciada por uma classe de enzimas conhecidas como DNA glicosilases, que catalisam a hidrólise da ligação *N*-glicosídica entre a base danificada e o esqueleto de dexoxirribose-fosfato, criando sítios apurínicos/apirimídicos (AP). A remoção dos sítios AP é um processo que envolve diversos passos e outras classes de enzimas, como as AP endonucleases, AP liases, exonucleases e ligases (FRIEDBERG et al., 1995; HOEIJMAKERS, 2001).

O sistema de reparo mais importante e versátil para a correção de danos induzidos pela radiação UVB no DNA é o que envolve a remoção de nucleotídeos (NER) (FRIEDBERG et al., 1995; BIRREL et al., 2001; GARFINKEL; BAILIS, 2002). O NER permite a remoção dos dímeros de pirimidina do tipo ciclo butano e dos 6-4

fotoprodutos. No total, mais de 25 proteínas diferentes participam do NER (HOEIJMAKERS, 2001).

São conhecidas dezenas de *loci* para sensibilidade à radiação em *S. cerevisiae* (REYNOLDS; FRIEDBERG, 1981; FRIEDBERG et al., 1995; BRENDEL; HENRIQUES, 2001; BIRRELL et al., 2001). Esses genes foram divididos em três grupos epistáticos distintos (RAD3, RAD52 e RAD6), que são responsáveis por diferentes respostas celulares à radiação (FRIEDBERG et al., 1995). Como toda característica poligênica, a tolerância à radiação UV apresenta natureza quantitativa. Pode-se observar uma grande variabilidade na tolerância à radiação UV, tanto entre espécies, como entre linhagens de leveduras e de fungos filamentosos (RASANAYAGAM et al., 1995; FARGUES et al., 1996; GUNASEKERA et al., 1997; MOODY et al., 1999; BRAGA et al., 2001d).

1.6 - Fotobiologia e fotoquímica de conídios

Os efeitos adversos da radiação UVB e da radiação solar na viabilidade, culturabilidade e germinação de conídios foram demonstrados em diversos trabalhos (MOORE et al., 1993; MORLEY-DAVIS et al., 1995; FARGUES et al., 1996; FARGUES et al., 1997; BRAGA et al., 2001a,b,c,d; BRAGA et al., 2002a,b; RANGEL et al., 2004; RANGEL et al., 2005; BRAGA et al., 2006). Estruturas metabolicamente ativas, como hifas em fungos miceliais e células vegetativas em leveduras, exibem uma série de respostas protetoras quando expostas a doses sub-letais de radiação. Essas respostas são iniciadas por danos em macromoléculas induzidos pela radiação ou por alterações em fotossensores (LINDEN et al., 1999; HELLINGWERF et al., 1996; SCHWERDTFER; LINDEN, 2001). Células dormentes ou com atividade metabólica limitada, como esporos de bactérias e de leveduras (NICHOLSON et al.,

2000) e conídios de fungos filamentosos (BRAGA et al., 1999), apresentam uma capacidade de reação limitada à radiação. Essas células são protegidas dos efeitos danosos da radiação UV por substâncias que foram sintetizadas durante a esporulação ou conidiogênese. Dentre essas substâncias protetoras estão pigmentos, proteínas capazes de interagir com o DNA, enzimas envolvidas no reparo e na desintoxicação celular e as proteínas de estresse ou heat shock (RENSING et al., 1998; KAWAMURA et al., 1999; BRAGA et al., 2006). A presença de substâncias protetoras aumenta a persistência ambiental das estruturas de resistência e/ou de dispersão. Apesar dos diversos trabalhos realizados, vários aspectos fisiológicos e moleculares da fotobiologia de conídios ainda não foram totalmente esclarecidos. A identificação dos genes envolvidos na tolerância à radiação solar que se expressam durante a conidiogênese e a identificação das substâncias protetoras presentes nos conídios serão passos fundamentais para o desenvolvimento de linhagens de fungos mais tolerantes à radiação. A obtenção de conídios mais tolerantes à radiação UV é altamente desejável para a ampliação do uso de fungos nos programas de controle biológico.

Ao contrário do que ocorre com esporos de bactérias (NICHOLSON et al., 2000), pouco se sabe a respeito da fotoquímica dos conídios de fungos filamentosos. Apenas alguns estudos foram realizados para a caracterização dos danos provocados pela radiação UV no DNA genômico ou mitocondrial de conídios e pouco se sabe a respeito dos efeitos da radiação em outras biomoléculas (CHELICO et al., 2005). A importância da pigmentação dos conídios para a fotoproteção foi demonstrada para alguns fungos filamentosos, inclusive *M. anisopliae* (BRAGA et al., 2006). Outros estudos estão sendo conduzidos pelo nosso grupo, com o objetivo de realizar o isolamento e a identificação de substâncias

fotoprotetoras presentes em conídios *de M. anisopliae* e de identificar os genes envolvidos na biossíntese dessas substâncias (dados não publicados).

1.7 - A quantificação de danos no DNA induzidos pela radiação UV

A quantificação de lesões no DNA permite que se determine não só o nível de dano induzido por agentes mutagênicos, como também a habilidade das células em reparar tais danos (SUTHERLAND et al., 2006). O estabelecimento de uma metodologia eficiente para quantificar os danos induzidos pela radiação solar em conídios permitirá: (1) a determinação da intensidade de dano induzido no DNA de conídios após exposição a diferentes doses de radiação UVB, (2) a comparação dos níveis de dano induzidos pela radiação em conídios de linhagens selvagens que apresentam diferentes níveis de tolerância à radiação, (3) a comparação da cinética do reparo desse tipo de lesão durante as fases iniciais da germinação de conídios que foram expostos a doses sub-letais de radiação UVB e (4) a estimativa do efeito fotoprotetor de pigmentos e de outros metabólitos presentes em conídios através da comparação da intensidade das lesões formadas em conídios selvagens e em mutantes para a síntese desses possíveis fotoprotetores.

Diversas metodologias estão sendo utilizadas para determinar a presença e/ou para quantificar dímeros de pirimidina formados no DNA após exposição à radiação UV. Dentre as principais, podem-se citar: (1) a eletroforese quantitativa em gel de agarose alcalino (SUTHERLAND et al., 1980; 2001; 2006; AHMED: SETLOW, 1993; HIDEMA et al., 1997; 2000; YOU et al., 2001; OGUMA et al., 2001; CHELICO et al., 2005; BING – RONG et al., 2008), (2) Ensaio de cometa (BHANOORI; VENKATESWERLU, 1998), (3) Imunoblot (YOU et al., 2001; PECCIA J; HERNADEZ M, 2002) com a utilização de anticorpos monoclonais capazes de reconhecer

diferentes fotoprodutos induzidos pela radiação UVB (van PRAAG et al., 1993; DONNELLY et al., 1995; JOUX et al., 1999; KOBAYASHI et al., 2001 CHELICO, KHACHATOURIANS, 2008; BING – RONG et al., 2008; LIMA – BESSA et al., 2008) e (4) HPLC, que permite o isolamento e a quantificação de fotoprodutos específicos (DOUKI et al., 2003; CADET et al., 2005; MOELLER et al., 2007).

Neste trabalho, foi utilizada a eletroforese quantitativa em gel alcalino para quantificar dímeros de pirimidina (CPDs) e conídios de *A. fumigatus, A. nidulans* e *M. anisopliae*. A técnica baseia-se no tratamento do DNA com a enzima T4 endonuclease V (Figura 3), que reconhece lesões específicas no DNA e induz uma quebra simples, adjacente à lesão, em uma das cadeias do DNA (YASUDA; SEKIGUCHI,1970; GATES; LINN, 1977).

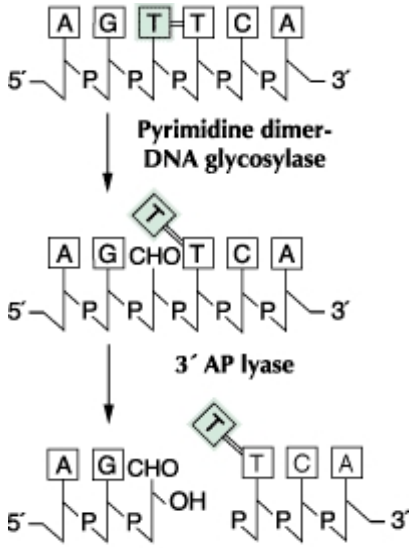

Figura 3. Reconhecimento e quebra da cadeia de nucleotídeo adjacente ao CPD pela enzima T4 endonuclease V. Figura extraída do protocolo do fabricante da enzima (Epicentre Biotechnologies – EUA).

Após o tratamento com a enzima, o DNA é desnaturado e os fragmentos fita simples são separados em gel alcalino. A dispersão dos fragmentos é analisada

através de análise densitometrica para a estimativa do tamanho médio do fragmento de cada amostra e o tamanho médio é utilizado para estimar a freqüência de CPDs (SUTHERLAND et al., 2006).

Apesar da eletroforese quantitativa em gel alcalino fornecer um meio sensível para quantificação direta de danos no DNA, poucos estudos foram realizados para quantificar CPDs utilizando essa metodologia. Sutherland et al. (1980) utilizaram a técnica para quantificar CPDs em células da pele de voluntários saudáveis expostas a diferentes doses de radiação UVC (254 nm). Freeman et al. (1989) também realizaram estudos com pele humana e demonstraram que houve um aumento de CPDs quando as células foram expostas à luz (275, 282, 290, 296, 304, 313, 334 e 365 nm) . You et al. (2001) demonstraram que os CPDs são responsáveis por pelo menos 80% das mutações induzidas pela radiação UVB em células da pele de camundongo. A quantificação de CPDs também foi feita em arroz (*Oryza sativa*) exposto a radiação UVB (HIDEMA et al., 1997; 2000). Ahmed e Setlow, 1993 quantificaram os danos no peixe *Xiphophorus* exposto às radiações com comprimentos de onda de 290, 302, 313 e 365 nm. Slieman e Nicholson (2000) quantificaram os danos em esporos de *Bacillus subtilis* expostos à radiação UVC (0, 2, 4, 8 e 16 KJ m^{-2}). Oguma et al. (2001), estudaram os mecanismos de inativação pela UV, foto reparo e reparo no escuro em *Escherichia coli* e *Cryptosporidium parvum* após exposicões à radiação com comprimento de onda de 254 nm. Apenas um trabalho utilizou a técnica para quantificar CPDs em fungos filamentosos (CHELICO et al., 2005).

No presente trabalho, foram estimados os CPDs induzidos por exposições a diferentes doses de radiação UVB em conídios de *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *M. anisopliae* var. *anisopliae* e var. *acridum*. A frequência de CPDs foi correlacionada

com a cinética de germinação dos conídios. Também foram quantificados os CPDs em conídios selvagens, com coloração verde, e em mutantes albinos de *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

1.8 - Genômica, análise da expressão gênica em larga escala e *microarray*s de DNA

O perfil de transcrição do genoma ou transcriptoma é um determinante maior do fenótipo e do funcionamento celular e pode ser utilizado para predizer o modo de ação de agentes físicos e químicos e para caracterizar alterações na transcrição de genes em resposta a perturbações metabólicas (GASCH et al., 2000; FREIMOSER et al., 2005). Os arrays de DNA são, hoje, poderosas e versáteis ferramentas da genômica, tendo diversas aplicações importantes (GASCH, 2002; SESTO et al., 2002). A construção de macro e de *microarray*s de DNA tem permitido o estudo da expressão gênica em escala genômica em diversas espécies de fungos (JIANG et al., 2002; FREIMOSER et al., 2005).

Breakspear e Momany (2007) revisaram 50 trabalhos de *microarray*s em fungos filamentosos tendo sido examinados os transcriptomas de mais de 20 espécies. Genes envolvidos em vários estágios da patogenicidade foram identificados. Em *A. fumigatus*, diversos trabalhos utilizaram microarrays genômicos para o estudo de transcriptomas. Os microarrays foram utilzados em estudos de patogenicidade e interação parasita/hospedeiro (CORNISHI et al., 2008; LOEFFLER et al., 2009; SUGUI et al., 2008; WANG et al., 2007), variabilidade genética (FEDOROVA et al., 2009) e resposta a fungicidas (FERREIRA et al., 2006). Lamarre et al. (2008) mostraram que, no conídio de *A. fumigatus*, a saída da dormência está associada à mudança do metabolismo fermentativo para o metabolismo respiratório.

Breakspear e Momany (2007) identificaram o acúmulo de transcritos de genes relacionados à conidiogênese (*dewA*, *fluG*, *stuA*) durante o início do crescimento vegetativo em *A. nidulans*.

Diversos aspectos do desenvolvimento fúngico e da conidiogênese permanecem desconhecidos. No presente trabalho, foram utilizados *microarrays* genômicos, que permitem a análise simultânea de aproximadamente 11.000 transcritos de *A. fumigatus*, para identificar genes diferencialmente expressos nas fases da conidiogênese e para identificar genes modulados pela radiação UVB em micélio do fungo.

2 - Objetivos

2 - OBJETIVOS

2.1 - Quantificar, através de eletroforese quantitativa em gel de agarose alcalino, dímeros de pirimidina no DNA de conídios de *A. fumigatus*, *A. nidulans* e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e var. *acridum* induzidos por diferentes doses sub-letais de radiação UVB.

2.2 - Correlacionar a intensidade de dímeros induzidos pela radiação UVB com a cinética de germinação dos conídios das três espécies.

2.3 - Comparar a frequência de dímeros induzidos pela radiação UVB nos conídios selvagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* com a frequência de dímeros em um mutante albino para estimar o efeito protetor da pigmentação.

2.4 - Identificar os genes diferencialmente expressos durante as fases da conidiogênese de *A. fumigatus*. A identificação foi feita comparando-se o transcriptoma de micélios nas fases da conidiogênese com o transcriptoma de micélio jovem (antes do início da conidiogênese).

2.5 - Identificar os genes modulados pela radiação UVB em micélio jovem de *A. fumigatus*. A identificação foi feita comparando-se o transcriptoma de micélio exposto à dose subletal de radiação com o transcriptoma de micélio não-exposto.

3 - Materiais e Métodos

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Efeitos da radiação UVB em conídios de *A. fumigatus*, *A. nidulans* e *M. anisopliae* var. *anisopliae e* var. *acridum*

3.1.1 - Espécies e linhagens utilizadas

Foram utilizadas as linhagens selvagens, ARSEF 324 de *M. anisopliae* var. *acridum*, ARSEF 23 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (ambas com conídios verde escuros) e o mutante DWR 180 (ARSEF 6998) de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (com conídios brancos) derivado da linhagem ARSEF 23 (Braga et al, 2001). As linhagens de *Metarhizium* foram obtidas da "USDA-ARSEF collection of Entomopathogenic Fungal Cultures" (U.S. Plant, Soil and Nutrition Laboratory, Ithaca, NY). A linhagem ATCC 10074 de *A. nidulans* (conídios verde escuros) foi obtida da ATCC "American Type Culture Collection" (Manassas, VA). A linhagem mutante CEA 17 de *A. fumigatus* (*pyrG*$^-$) (conídios verde escuros) foi obtida da linhagem selvagem CEA 10 (CBS 144-89) como previamente descrito (D'ENFERT et al, 1996). A morfologia macroscópica e coloração das linhagens crescidas em meio ágar batata dextrose (PDA) são mostradas na Figura 4.

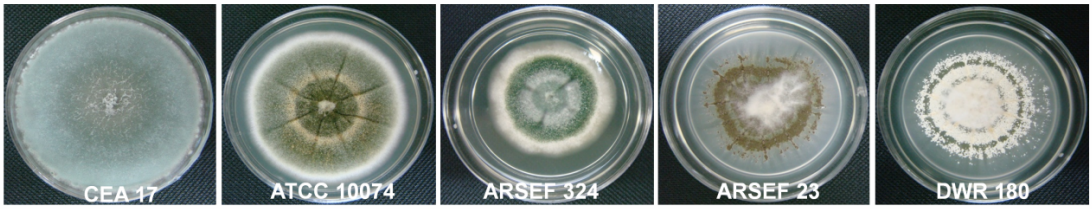

Figura 4. Da esquerda para a direita, colônias de *A. fumigatus* (CEA 17), *A. nidulans* (ATCC 10074), *M. anisopliae* var. *acridum* (ARSEF 324), *M. anisopliae* var. *anisopliae* (ARSEF 23) e do mutante albino (DWR 180) derivado da linhagem selvagem ARSEF 23.

3.1.2 - Obtenção de conídios

Em tubos de vidro (Schott GL 18, EUA) foram preparados 2 mL de suspensões de conídios em solução 0,01% (v/v) de tween-80 (Sigma - Aldrich, EUA). As suspensões foram, a seguir, filtradas em lã de vidro silanizada autoclavada (Alltech, Massachusetts - EUA). A concentração de conídios nas suspensões foi determinada através de contagens em câmara de Neubauer (Boeco, Alemanha) e a concentração final das suspensões foi ajustada para 1×10^{8} células mL^{-1}. Cem µL de suspensão foram inoculados em placas de Petri (90 × 15 mm), contendo 23 mL de meio PDA (Difco, EUA), suplementado com extrato de levedura (1 g L^{-1}) (Difco, EUA) (PDAY). As placas foram incubadas (Incubadora B.O.D 411D Nova Ética, Brasil) por 12 dias (*M. anisopliae*) e 5 dias (*A. nidulans* e *A. fumigatus*), no escuro, a 28°C. Após esse período, as placas foram armazenadas na geladeira (4ºC) até o momento de uso.

3.1.3 - Determinação das dimensões dos conídios

Para determinar o comprimento dos conídios de *Metarhizium* spp., que têm forma de bastão, e o diâmetro dos conídios de *A. nidulans* e *A. fumigatus*, foram fotografadas suspensões de conídios, utilizando-se uma câmera (Olympus, modelo Camedia C5060), acoplada a um microscópico de luz comum (Olympus modelo CX31), com ampliação de 400 ×. As dimensões dos conídios foram determinadas utilizando-se o programa analisador de imagens Image J 1.42q (Nacional Institutes of Health, USA, http://rsb.info.nih.gov/ij).

3.1.4 - Câmara de exposição, lâmpadas e filtro

As exposições à radiação UVB foram realizadas em câmara com circulação interna de ar (Nova Ética, SP, Brasil). A radiação UVB foi fornecida por duas lâmpadas fluorescentes TL-20W/12 RS (Philips, Eindhoven, Holanda), com pico de emissão em 313 nm. Para a obtenção de um nível estável de emissão ao longo dos experimentos, as lâmpadas foram envelhecidas por 100 horas antes de serem utilizadas. A irradiância espectral foi medida em incrementos de 1 nm, com um espectroradiômetro com duplo monocromador (Optronic Model 742, Orlando, FL), como descrito por Braga et al. (2001a,b). O espectro de ação de dano no DNA (dimerização de pirimidinas), desenvolvido por Quaite et al. (1992) e normalizado para a unidade a 300 nm, foi utilizado para calcular a irradiância da UVB, como descrito e discutido anteriormente (BRAGA et al., 2002) (Figura 5).

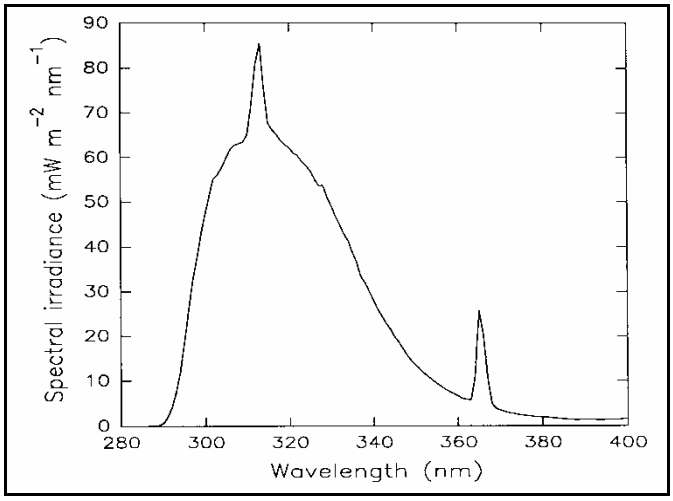

Figura 5. Irradiância espectral das lâmpadas filtradas com diacetato de celulose.

3.1.5 - Preparo das suspensões de conídios para as exposições

Foram preparados 250 mL de uma suspensão de conídios em solução de Tween 80 0,01% (v/v) em um frasco de 1 L (Boeco, Alemanha). A suspensão foi agitada vigorosamente e filtrada em gaze para remover fragmentos de micélio. A concentração final de células foi ajustada para 1×10^8 conídios mL^{-1}.

As suspensões foram distribuídas em tubos de 50 mL de polipropileno (Corning, México) e centrifugadas (Centrifuge 5810R - Eppendorf, Alemanha) a 5.000 *g* por 20 min. Os sobrenadantes foram retirados cuidadosamente com uma pipeta de 10 mL e o sedimento foi ressuspenso em 50 mL de salina tamponada com fosfato (PBS 1x) [137 mM de NaCl (Sigma - Aldrich, EUA), 2,7 mM de KCl (Synth, Brasil), 10 mM de Na_2HPO_4 (Synth, Brasil) e 2 mM de KH_2PO_4 (Synth, Brasil)]. A concentração foi ajustada, quando necessário, para 1×10^8 células mL^{-1} . Uma parte foi imediatamente congelada para a obtenção do DNA de conídios não-expostos à radiação UVB.

3.1.6 - Exposições dos conídios à radiação UVB

Dentro da câmara de exposição, foi adaptado um sistema com um agitador orbital (modelo TS- 2000 A tipo VDRL - Biomixer, China), com a velocidade regulada em 60 rpm para manter a homogeneidade da suspensão durante as exposições. No agitador, foram colocadas 4 placas de Petri (150 x 15 mm) por experimento e foi retirada uma placa após cada período de exposição (Figura 6).

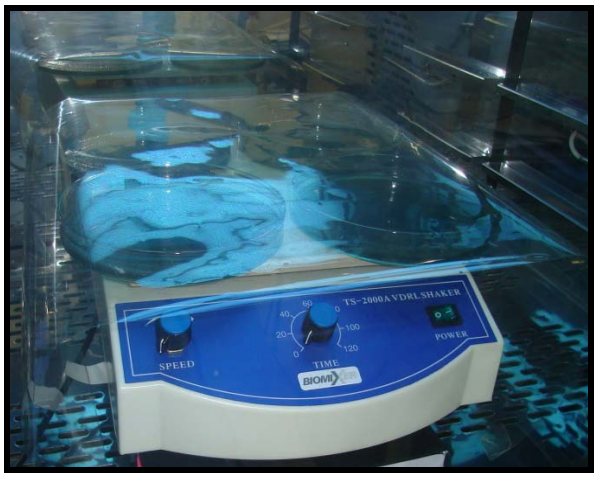

Figura 6. Sistema montado dentro da câmara de exposição. Um agitador orbital (modelo TS- 2000 A tipo VDRL - Biomixer, China), 4 placas de Petri (150 × 15 mm) com as suspensões de conídios e o filme de diacetato de celulose com 0,13 mm de espessura (JCS Industries, Le Mirada, CA, EUA).

Em cada placa foram colocados 50 mL de suspensão. A profundidade do líquido foi de aproximadamente 0,3 cm. Durante as exposições, as placas foram cobertas com filme de diacetato de celulose com 0,13 mm de espessura (JCS Industries, Le Mirada, CA, EUA), que bloqueia radiações com comprimentos de onda menores do que 290 nm. O filtro permite a passagem da maior parte das radiações UVA e UVB, mas filtra a radiação UVC (<280 nm) e a radiação UVB com comprimentos de onda menores que 290 nm. Os conídios foram expostos à irradiância de 1000 mW m^{-2} UV por 15, 30, 60 e 90 min e as doses totais ao final das exposições foram 0.9, 1.8, 3.6 and 5.4 kJ m^{-2}, respectivamente. Após as exposições, foi retirada uma alíquota (1 mL) de cada tratamento, que foi transferida para um tubo de vidro (Schott GL 18, EUA) para determinar os efeitos das diferentes doses na germinação dos conídios. Os 49 mL restantes foram transferidos para um tubo de 50 mL (Corning, México) e centrifugados por 20 minutos a 5.000 *g*, a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente removido, os conídios foram

imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até a extração do DNA.

3.1.7 - Determinação do efeito da radiação UVB na germinação dos conídios

Os experimentos de germinação foram realizados em placas de Petri (60 × 15 mm) contendo 7 mL de meio PDAY acrescido de 0,0015% (m/v) de benomyl (Sigma - Aldrich, EUA). Essa concentração de benomyl permitiu o monitoramento da germinação das três espécies por até 72 h, pois inibe o crescimento de hifas sem afetar adversamente a germinação (Braga et al., 2006). Os conídios (duas gotas de 20 µl da suspensão contendo 10^5 conídios mL^{-1}) foram colocados sobre o meio e as placas foram incubadas, no escuro, a 28 °C. A germinação dos conídios foi observada com ampliação de 400 × após 6, 12, 24, 36, 48 e 72 h. Em cada experimento, foram avaliados 300 conídios por tratamento.

3.1.8 - Análises estatíticas do efeito da radiação UVB na germinação dos conídios

Os efeitos dos períodos de exposição à radiação UVB (15, 30, 60 e 90 min) e dos períodos de germinação (12, 24, 36, 48 e 72 h) foram avaliados usando-se análise de variância com dois fatores (two-way). Os dados de cada linhagem foram analisados separadamente. Não houve necessidade de transformações dos dados para as análises. Os níveis de significância das comparações entre as médias foram avaliadas pelo método *t* Student e o $P < 0.05$ foi considerado significativo. Todas as análises foram feitas utilizando-se o aplicativo PROC GLM no programa SAS/STAT Version 9.0.

3.1.9 - Quantificação de dímeros de pirimidina do tipo ciclobutano em conídios

3.1.9.1 - Extração, purificação e quantificação do DNA genômico

Nos tubos de 50 mL contendo os conídios congelados foram adicionados 5 mL de pérolas de vidro previamente tratadas (o protocolo de tratamento é descrito no final do tópico) (Ausbel et al., 1995) e 5 mL de tampão de extração de DNA [200 mM de Tris – HCl, pH 8,5 (Sigma - Aldrich, EUA e Synth, Brasil), 250 mM de NaCl (Sigma - Aldrich, EUA), 25 mM de EDTA, pH 8 (Merck, Alemanha) e 0,5% (m/v) de SDS (Sigma - Aldrich, EUA)]. Para rompimento da parede celular, a mistura foi agitada em vórtex por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado, transferido para tubos de 15 mL e purificado com fenol - clorofórmio (Sambrook e Russel et al, 2001). Foram adicionados 5 mL de fenol-clorofórmio (Invitrogen, EUA e Synth, Brasil) e a mistura foi centrifugada a 5.000 *g*, por 15 min. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para outro tubo de 15 mL e foram adicionados 5 mL de clorofórmio (Synth, Brasil). As amostras foram centrifugadas a 5.000 *g*, por 5 minutos, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e, a seguir, foi adicionado um volume de isopropanol (Merck, Alemanha) correspondente à metade do volume do sobrenadante. Os tubos foram mantidos a -20°C, por aproximadamente 12 h. As amostras foram centrifugadas a 5.000 *g*, por 1 minuto, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado novamente a 5.000 *g*, por um minuto. O sobrenadante foi descartado e o resíduo de etanol foi evaporado em temperatura ambiente por 30 minutos. O precipitado foi ressuspenso em água milli-Q estéril (aproximadamente 200 µl) e estocado a - 20°C. A integridade do DNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose (UltraPure™Agarose, Invitrogen, EUA) 1% (m/v), em tampão TAE 1× [200 mM de Tris Base, pH 8,5 (Sigma - Aldrich, EUA), 250 mM de NaCl (Synth, Brasil), 25 mM EDTA, pH 8 (Merck, Alemanha) e 0,5% (p/v) de SDS (Sigma - Aldrich, EUA)].

A remoção do RNA contaminante foi feita tratando-se a solução de DNA (50 µL) com 10 mg mL^{-1} de RNAse A (GE Healthcare, EUA). A reação foi incubada por 1 h, a 37°C. Em seguida, adicionou-se um volume igual de fenol - clorofórmio (1:1) e os tubos foram centrifugados a 20.817 *g*, por 15 minutos. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo microtubo, e foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio. As amostras foram centrifugadas a 20.817 *g*, por 5 minutos e a fase aquosa foi transferida para outro microtubo e foram adicionados 2,5 volumes de etanol 100% e 0,1 volume de acetato de sódio 3 M para precipitar o DNA. Os tubos foram mantidos a - 80°C por, no mínimo, 2 h. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 20.817 *g*, por 15 minutos, e o sobrenadante foi descartado.O precipitado foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente a 20.817 *g*, por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o resíduo de etanol foi evaporado à temperatura ambiente por 30 minutos. O precipitado foi ressuspenso em água estéril e estocado a - 20°C. A pureza do DNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose a 1%, como descrito anteriormente.

A quantificação do DNA presente na amostra foi obtida pela medida da absorbância em espectrofotômetro (Shimatzu, Japão), nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm. A leitura a A_{260nm} permite o cálculo da concentração dos ácidos nucléicos na amostra, através da fórmula: DO × diluição × k= µg mL^{-1}, sendo DO a densidade ótica, K uma constante que utiliza o valor 50 para DNA. A relação entre A_{260nm} e A_{280nm} (DO260/DO280) fornece uma estimativa da pureza dos ácidos nucléicos. Soluções puras de DNA possuem valores de DO260/DO280 próximos de 2. Se existe contaminação com fenol ou proteínas, a relação DO260/DO280 será muito menor e a precisão da quantificação será baixa.

Tratamento das pérolas de vidro: As pérolas de vidro (2 mm de diâmetro médio) (Vitrilab, SP - Brasil) foram cobertas com uma mistura de ácido nítrico (Synth, Brasil) e água destilada (1:1). A mistura foi agitada por 30 minutos e o ácido nítrico desprezado (Synth, Brasil). A seguir, as pérolas foram lavadas dez vezes com água destilada e incubadas a 37°C, por 24 h, em uma solução 0,1% (m/v) de água com dietil pirocarbonato (DEPC) (Sigma - Aldrich, EUA). A seguir, foram autoclavadas a 120°C, por 20 min, e secas em forno a 180°C.

3.1.9.2 - Digestão do DNA com a enzima T4 endonuclease V

As soluções de DNA foram tratadas com a enzima T4 endonuclease V (Epicentre Biotechnology, EUA). A reação enzimática foi realizada com 5 µg de DNA, 5 U da enzima T4 endonuclease V (20 U μL^{-1}), 10 µL do tampão da enzima [0,01 mM de EDTA (Merck, Alemanha) e 0,04 mM de N_aPO_4 (Synth, Brasil) pH 6,5], por 1 h, a 37ºC, em um volume final de 20 µL. Foram preparados dois controles, um contendo DNA de conídios não expostos e não tratado com a enzima e outro contendo DNA de conídios não-expostos tratado com a enzima.

Foram adicionados 10 µL do tampão alcalino [100 mM NaOH (Sigma - Aldrich, EUA), 4 mM EDTA (Merck, Alemanha)] às amostras de DNA e ao marcador de tamanho molecular (DNA de fago Lambda digerido com a enzima Pst I) e a mistura foi incubada por 20 min, a 24ºC. Essa etapa interrompe a digestão pela endonuclease e desnatura o DNA das amostras. A seguir, foram adicionados 5 µL de loading buffer [0,25% (m/v) de azul de bromofenol (Sigma - Aldrich, EUA), 0,25% (m/v) de xileno cianol FF (Sigma - Aldrich, EUA) e 25% (v/v) de glicerol (Synth, Brasil)]. O volume total de 35 µL foi aplicado no gel.

3.1.9.3 - Eletroforese quantitativa em gel de agarose alcalino

A eletroforese quantitativa em gel de agarose alcalino foi realizada como descrito anteriormente (SUTHERLAND et al., 2006). O gel alcalino 1% (m/v) foi preparado diluindo-se 0,6 g de agarose (UltraPure™Agarose, Invitrogen, EUA) em um volume final de 60 mL de solução [50 mM de NaCl (Sigma - Aldrich, EUA) e 4 mM EDTA (Merck, Alemanha)]. O gel foi colocado na cuba de eletroforese (Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP) e incubado com 400 mL de tampão alcalino [30 mM NaOH (Sigma - Aldrich, EUA) e 2 mM EDTA (Merck, Alemanha)] durante 12 h, a 24ºC. O mesmo tampão foi utilizado para a corrida.

Para evitar o superaquecimento do gel durante a corrida, foi utilizada uma baixa voltagem (1,4 V cm^{-2}) durante 3 horas. O λ DNA digerido com PstI (14,1, 5,08, 2,84, 1,5 kb) foi usado como marcador de peso molecular. Após a eletroforese, os géis foram neutralizados com 500 mL de solução Tris - HCl 0,5 M (Sigma - Aldrich, EUA), pH = 8,0, por 30 minutos, a 24 ºC, com agitação. Os géis foram corados em 200 mL de solução de brometo de etídio (1 μg mL^{-1}) (Sigma - Aldrich, EUA) por 10 min. Para retirar o excesso do corante, os géis foram lavados três vezes com 200 mL de água milli-Q e mantidos em 200 mL de água milli-Q, por 16 h.

3.1.9.4 - Determinação da frequência dos dímeros de pirimidina do tipo ciclobutano

Os dímeros de pirimidina do tipo ciclobutano foram calculados como previamente descrito por Oguma et al. (2006). As imagens digitais dos géis foram obtidas através do programa Quantity One 4.6.1 (BioRad). A fluorescência do DNA foi detectada em pixels e o padrão da distribuíção da intensidade de fluorescência em relação à distância da migracão foi obtido. O total de pixels representa a área

integrada pela intensidade de fluorescência, correspondendo à quantidade total da amostra de DNA. O ponto médio da massa de DNA é a distância da migração mediana de cada amostra e foi determinado graficamente através do programa Graph Pad Prism v.4 (www.grahpad.com, San Diego, California - USA). Os valores medianos da distância foram convertidos em comprimento molecular mediano de DNA (L_{med}) por meio de curva de regressão quadrática obtida pela análise da migração dos marcadores de peso molecular. O comprimento molecular médio do DNA foi obtido pela equação 1 (VEATCH; OKADA, 1969).

$$Ln = 0.6 \times L_{med} \quad (1)$$

A partir dos comprimentos moleculares médios das populações de DNA (L_n), foi estimada a frequência de CPDs pela equação 2.

$$\Phi = (L_n t)^{-1} - (L_n 0)^{-1} \quad (2)$$

Sendo $L_n t$ o comprimento médio da população de moléculas expostas à radiação UV por t minutos e $L_n 0$ o comprimento médio do controle não exposto à radiação. Como L_n é expresso em Kb, Φ é expresso em CPDs kb^{-1}.

3.2 - Identificação de genes diferencialmente expressos durante as fases da conidiogênese de A. *fumigatus*

3.2.1 - Linhagem de *A. fumigatus*

Os experimentos foram conduzidos com a linhagem CEA 17 de *A. fumigatus*, que foi cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP).

3.2.2 - Produção de conídios e preparação do inóculo

O fungo cresceu em placas de Petri (90 × 15 mm), contendo 23 mL de meio PDAY, no escuro, a 28°C, por 5 dias. Os conídios foram cuidadosamente recolhidos e suspensos em solução 0,01% (v/v) de tween 80 (Sigma Aldrich, Inc. St. Louis, MO) e a concentração da suspensão foi ajustada para 10^8 conídios mL^{-1}.

3.2.3 - Obtenção de micélio ao longo do desenvolvimento em meio PDAY

Os conídios (100 µL, 10^8 conídios mL^{-1}) foram espalhados na superfície de 23 mL de meio PDAY e as placas foram incubadas a 28°C, no escuro. Após 16, 20, 24 e 25 h de desenvolvimento, amostras das culturas foram coradas com lactofenol azul - algodão [20g de ácido lático, 20g de cristais de fenol, 20g de glicerina, 0,05g de azul algodão (Sigma - Aldrich, EUA) e 20 mL de água destilada] (LACAZ et al., 2002) e observadas em microscópio com ampliação de 400 × para a caracterização das etapas do desenvolvimento. Em cada um dos períodos de desenvolvimento, o micélio foi cuidadosamente raspado da superfície do meio, imediatamente congelado com nitrogênio líquido e mantido a - 80°C até o momento da utilização.

3.2.4 - Extração de RNA

Os micélios foram triturados em nitrogênio líquido e imediatamente misturados com o reagente Trizol (Invitrogen, EUA), para extração de RNA, de acordo com as recomendações do fabricante. Para verificar a integridade do RNA, 20 µg do RNA total de cada tratamento foram aplicados em gel de agarose (Invitrogen, EUA) 1,2% (m/v), com 2,2 M de formaldeído (Sigma Aldrich, EUA). O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em luz UV. A presença de bandas

intactas, referente aos RNAr 28 S e 18 S foi utilizada como critério para verificar a qualidade da extração. As amostras de RNA foram tratadas com DNase. A reação foi conduzida em um volume final de 50 µL de tampão [40 mM Tris-HCl, pH 7,5, 6 mM $MgCl_2$, 2,5 µL de 200 mM dithiothreitol (DTT)] contendo 40 U RNaseOUT (Invitrogen, EUA), 5 U de DNase livre de RNase (Promega, EUA) e 10 µg de RNA total. A mistura foi incubada a 37˚C, por 60 min, e a reação foi interrompida, incubando-se os tubos a 70˚C, por 15 min.

3.2.5 - Síntese e marcação fluorescente dos cDNAs, hibridação e escaneamento dos *microarray*s

Todos os experimentos foram conduzidos exatamente como descrito nos protocolos do J. Graig Venture Institute (JGVI) (http://pfgrc.tigr.org/protocols/). Foram feitas marcações a partir de RNAs provenientes de três experimentos independentes e foi feita a troca de fluoróforos (dye swap) em cada experimento. Os cDNAs foram marcados de maneira indireta com os fluoróforos (Cyanine 3 ou Cyanine 5), como descrito no protocolo SOP#: M007 (http://pfgrc.tigr.org/protocols/protocols.shtml). Durante a síntese da primeira fita do cDNA, foi incorporado o aminoalil-dUTP e, a seguir, os grupamentos aminoalil foram ligados com os fluoróforos Cy3 ou Cy5.

A hibridação dos cDNAs com o *microarray* de *A. fumigatus* (Pathogenic Functional Research Center) foi conduzida em câmaras plásticas (Corning), como descrito no protocolo SOP#: M008 (http://pfgrc.tigr.org/protocols/protocols.shtml). Após a hibridação, os *microarray*s foram lavados com aumento da estringência, secos por centrifugação e escaneados a 650 nm (fluorescência do Cy5) e a 535 nm (fluorescência do Cy3), com resolução de 10 µm, no scanner *GenePix* 4000B (Axon Instruments, Foster City, CA, EUA), com a utilização do software *GenePix Pro 6.0*. O

escaneamento gerou arquivos de imagens com extensão ".TIFF", que foram utilizados pelo programa de análise de imagem (Programa Spotfinder 3.2.0).

3.2.6 - Análise das imagens

Todos os programas utilizados nas análises são de livre acesso e foram obtidos diretamente do JGVI (http://pfgrc.tigr.org/tools.shtml). O programa TIGR Spotfinder 3.2.0 foi utilizado para a análise das imagens (extensão TIFF) geradas para cada fluoróforo (Cy3 e Cy5), em cada experimento, com a troca de marcação. Para cada imagem, foi definida uma grade de identificação, delimitando-se cada *spot* e extraindo-se dados relativos à intensidade do sinal, valores de fluorescência basal local (background) e de controle de qualidade. Os dados de cada experimento foram salvos em planilhas geradas pelo Spotfinder. Nessa planilha (arquivo de extensão .MEV), constam todos os dados relativos à leitura do scanner, leitura individual dos "spots", background e a qualidade de cada um dos parâmetros avaliados.

3.2.7 - Análise estatística

O programa TIGR Midas 2.20 foi utilizado para analisar os arquivos .MEV gerados pelo programa Spotfinder. O Midas possibilita a realização de diversos tipos de transformações matemáticas e normalização dos sinais. Os dados brutos contidos no arquivo .MEV foram submetidos a um segundo filtro de intensidade, que descartou todos os *spots* com valor mediano de sinal inferior a 1000 unidades análogo-digitais para os valores gerados a partir dos sinais obtidos de ambos os fluoróforos (Cy3 e Cy5). A seguir, as intensidades totais dos dois canais (Cy3 e Cy5) foram normalizadas, utilizando-se o método LOWESS (Locally Weighted Scatter plot

Smoothing). Após esse procedimento, um novo filtro equalizou os valores da razão Cy3/Cy5 em todos os setores da lâmina. Finalmente, os dados de cada experimento foram submetidos a uma análise de consistência com seu par invertido (*dye swap*). Em suma, para cada condição experimental, foram obtidos 4 sinais independentes para cada *spot* presente na lâmina de *microarray*. Após as etapas de normalização dos dados, os genes com expressão aumentada ou diminuída durante as condições estudadas foram identificados com um nível de confiança de 95%, através de critérios estatísticos não-paramétricos, utilizando-se limites de corte dependentes da razão de intensidades da fluorescência das hibridações ("intensity dependent z-scores") (z = 1,96) e parâmetros estringentes para função "*Slice analysis*" (ver Cheadle et al., 2003; Ferreira et al., 2006), gerando-se uma tabela com todas as informações de análises para posterior visualização.

Os valores das razões das intensidades de cada experimento foram carregadas no programa MeV 4.0 (Multi Experiment Viewer), que permite que se trabalhe simultaneamente com o resultado de várias hibridações, réplicas de um mesmo experimento ou múltiplos experimentos. A análise de agrupamento foi feita com o algoritmo "K-means" de clusterização (também disponível no programa MeV), utilizando-se a distância Euclidiana como algoritmo aglomerativo (para revisão desses métodos, ver Eisen et al., 1998).

3.2.8 - Validação do *microarray* das fases da conidiogênese de *A. fumigatus* por *Real-time RT-PCR*

Foram avaliadas por *Real-time RT-PCR* a expressão de oito genes cujas expressões diferenciais foram identificadas nos experimentos com *microarray*s. As reações de RT-PCR foram feitas no aparelho ABI Prism 7700 Sequence Detection

System (Perkin-Elmer Applied Biosystems). A transcrição reversa foi feita de acordo com Schummer et al. (1999), com modificações. Vinte μg de RNA total em 12 μL de água DEPC e desnaturado a 70°C, por 10 min, foram misturados com 1,5 μL de oligo dTV (100 pmol/μl, 5'ttt ttt ttt ttt ttt ttt ttt ttv3'). A seguir, adicionaram-se à mistura 5μl do "First Strand Buffer 5×" (Invitrogen), 2,5 μL de DTT 100 mM (Invitrogen), 0,5 μL de RNaseOut (Invitrogen) e 2,5μL de dNTPS (10 mM cada). A mistura foi pré-aquecida a 42°C, por 5 min; a seguir, adicionou-se 1 μL de SuperscriptII (200 U μL^{-1}, Invitrogen) e a reação foi mantida a 42°C, por 90 min. Ao final da incubação, o volume foi completado para 50 μl e as amostras foram utilizadas para a quantificação de RNAm em tempo real. Para cada reação, foram adicionados 5 μl de "TaqMan Universal PCR Master Mix" (Applied Biosystems), 1 pmol μL^{-1} de cada par de oligos (sonda e primer Lux, Invitrogen) e 1 μL de cDNA. As condições da amplificação foram: incubação inicial a 50°C, por 2 min, seguida por 10 min, a 95°C, 40 ciclos de 95°C, por 15 segundos, e de 60°C por 1 min. Como controle endógeno da quantificação de RNAm, foi utilizada a sonda alfa tubulina como normalizadora da expressão dos outros genes selecionados. A análise dos resultados foi feita como descrito anteriormente (SEMIGHINI et al., 2002). A identificação dos genes escolhidos, os *primers* e as sondas utilizados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos pares de *primers* e sondas fluorescentes utilizados nas reações de RT-PCR em Tempo Real para a validação dos experimentos com os *microarrays* das fases da conidiogênese em *A. fumigatus.*

Primers and probes*	Sequence (5' to 3')	*A. fumigatus Locus* ID	Name
AbaA-Probe	5'-cggataAGTGACGGCAGTTCTATC[FAM]G-3'	AFUA_1G04830	AbaA
AbaA-Primer	5'-GACAGGCTCCTTCGATTTCTTG-3'		
ADH-Probe	5'-cggacCAACGACTCCATCAACTATGTC[FAM]G-3'	AFUA_1G04620	Alcohol dehydrogenase
ADH-Primer	5'- GGTCCTTGTTGGCGTACACAC-3'		
Arp1-Probe	5'-cggtagGCCACCAATGAGCACTACTAC[FAM]G-3'	AFUA_2G17580	Scytalone dehydratase
Arp1-Primer	5'-ACCGCACGGTAGGTTTCAGG-3'		
BRT1-Probe	5'-cgacaaCATTAACCTTGACCACCTTGT[FAM]G-3'	AFUA_5G03780	L-PSP endoribonuclease
BRT1-Primer	5'-TCAAGAACCTCACGCATGTCCT-3'		
Cat2-Probe	5'-cggtaGAAAACCCCTTGGCGTAC[FAM]G-3`	AFUA_8G01670	Catalase-peroxidase
Cat2-Primer	5'-GACCTTTGGCTTCGCTGGAG-3'		
Hyp1-Probe	5'-cgggCACGAATTACTTCCACCC[FAM]G-3'	AFUA_2G16550	Hypothetical protein1
Hyp1-Primer	5'-CGCAGTTTCGCCTGGATCTC-3'		
Hyp2-Probe	5'-cggtaTGTTTCATCGAGATCAGTAC[FAM]G-3'	AFUA_7G00790	Hypothetical protein2
Hyp2-Primer	5'-ATGTTCACTTGCTCTGAGCTGAA-3'		
StuA-Probe	5'-cgtatgCCTCTGGACCGAGCACATA[FAM]G-3'	AFUA_2G07900	Transcription factor StuA
StuA-Primer	5'-TGGTTTGACAAGCCCATGAGAC-3'		
α-tub-Probe	5'-cgagatAGCAAGCAGAGGTGATCT[FAM]G-3'	AFUA_1G02550	Tubulin alpha1
α-tub-Primer	5'-TCTCTGCTGCCAAGGCTTCC-3'		

*Probes were fluoresently labeled with the indicated markers (TET, 6-carboxy-4,7,2',7'-tetrachlorofluorescein; 6-FAM, 6-carboxyfluorescein; TAMRA, 6-carboxy- N,N,N',N'-tetramethylrhodamine) Probe Lux (Invitrogen).

3.3 - Identificação de genes modulados por exposições sub-letais à radiação UVB em micélio jovem de *A. fumigatus*

3.3.1 - Linhagem de *A. fumigatus*

Os experimentos foram conduzidos com a linhagem CEA 17 de *A. fumigatus*.

3.3.2 - Produção de conídios e preparação do inóculo

O fungo cresceu em placas, contendo 23 mL de meio PDAY, no escuro, a 28°C, por 5 dias. Os conídios foram suspensos em solução (0,01% v/v) de tween 80

(Sigma Aldrich, Inc. St. Louis, MO) e a concentração da suspensão foi ajustada para 10^8 conídios mL^{-1}.

3.3.3 - Obtenção de micélio e exposição à radiação UV

Os conídios (100 µL, 10^8 conídios mL^{-1}) foram espalhados na superfície de 23 mL de meio PDAY e as placas foram incubadas a 28°C, no escuro, por 16 h. Depois o micélio foi exposto à irradiância de 1000 mW m^{-2} (irradiância calculada pelo espectro de ação de Quaite et al., 1992), por 30 min. A dose de radiação UV biologicamente efetiva ao final da exposição foi 1,8 kJ m^{-2}. Após a exposição, metade das placas foi incubada a 28°C, no escuro, por 30 min. Tanto no primeiro, como no segundo caso, o micélio foi raspado do meio após o tratamento e imediatamente congelado em nitrogênio líquido. Como controle, foi utilizado micélio não exposto à radiação.

3.3.4 - Extração de RNA, marcação, hibridação e análise dos *microarrays* de *A. fumigatus*

Todas as etapas foram feitas exatamente como descritas nos itens 3.2.4, 3.2.5, 3.2.6 e 3.2.7.

3.3.5 - Validação do *microarray* da exposição subletal à radiação UVB de *A. fumigatus* por *Real-time RT-PCR*

As expressões de quatro genes diferencialmente expressos, identificados nos experimentos com *microarray*s, também foram avaliadas por *Real-time RT-PCR*. As reações de RT-PCR foram feitas no aparelho ABI Prism 7700 Sequence Detection

System (Perkin-Elmer Applied Biosystems). A transcrição reversa foi feita de acordo com Schummer et al (1999), com modificações. Vinte μg de RNA total purificado em 12 μL de água DEPC e desnaturado a 70°C, por 10 min, foram misturados com 1,5 μL de oligo dTV (100pmol/μl, 5'ttt ttt ttt ttt ttt ttt ttt ttv3'). A seguir, adicionaram-se à mistura 5μl do "First Strand Buffer5×" (Invitrogen), 2,5 μL de DTT 100 mM (Invitrogen), 0,5 μL de RNaseOut (Invitrogen) e 2,5μL de dNTPS (10 mM cada). A mistura foi pré-aquecida a 42°C, por 5 min; a seguir, adicionou-se 1 μL de SuperscriptII (200 U μL^{-1}, Invitrogen) e a reação foi mantida a 42°C, por 90 min. Ao final da incubação, o volume foi completado para 50 μl e as amostras foram utilizadas para a quantificação de RNAm em tempo real. Para cada reação, foram adicionados 5 μl de "TaqMan Universal PCR Master Mix" (Applied Biosystems), 1 pmol μL^{-1} de cada par de oligos (sonda e primer Lux, Invitrogen) e 1 μL de cDNA. As condições da amplificação foram: incubação inicial a 50°C, por 2 min, seguida por 10 min, a 95°C, 40 ciclos de 95°C, por 15 segundos, e de 60°C por 1 min. Como controle endógeno da quantificação de RNAm, foi utilizada a sonda alfa tubulina como normalizadora da expressão dos outros genes selecionados. A análise dos resultados foi feita como descrito anteriormente (Semighini et al. 2002). A identificação dos genes escolhidos, os *primers* e as sondas utilizados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos pares de *primers* e sondas fluorescentes utilizados nas reações de RT-PCR em Tempo Real, para a validação dos experimentos com os *microarrays.*

Primers and probes*	**Sequence (5' to 3')**	***A. fumigatus* *Locus* ID**	**Name**
Cat2-Probe	5'-cggtaGAAAACCCCTTGGCGTAC[FAM]G-3`	AFUA_8G01670	Catalase-peroxidase
Cat2-Primer	5'-GACCTTTGGCTTCGCTGGAG-3'		
Cdc25-Probe	5'-cggaaAGGTGATCTGATATGTCTTC[FAM]G-3'	AFUA_2G16240	Cell division control protein
Cdc25-Primer	5'-ACGCTGCTGAATGGAGATCG-3'		
HSP30-Probe	5'-cggtgAACGCAACTACAACAACAC[FAM]G-3'	AFUA_6G06470	Heat Shock Protein
HSP30-Primer	5'-GGGACTTGGTGGATGAGCTGT-3'		
RadC-Probe	5'-cggatTGTAGATTTCCCAGCATC[FAM]G-3'	AFUA_4G06970	RadC
RadC-Primer	5'-CCGATAAAGGAGCCTGTTCTAGC-3'		
α-tub-Probe	5'-cgagatAGCAAGCAGAGGTGATCT[FAM]G-3'	AFUA_1G02550	Tubulin alpha1
α-tub-Primer	5'-TCTCTGCTGCCAAGGCTTCC-3'		

*Probes were fluoresently labeled with the indicated markers (TET, 6-carboxy-4,7,2',7'-tetrachlorofluorescein; 6-FAM, 6-carboxyfluorescein; TAMRA, 6-carboxy- N,N,N',N'-tetramethylrhodamine) Probe Lux (Invitrogen).

4 – Resultados e Discussão

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Efeitos da radiação UVB em conídios de *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *M. anisopliae* var. *anisopliae e M. anisopliae* var. *acridum*

4.1.1 - Dimensão dos conídios

A forma e o tamanho das células são características que podem influenciar a intensidade de danos induzidas pela radiação UVB. Os conídios de *A. fumigatus*, *A. nidulans* e *M. anisopliae* (var. *acridum* e var. *anisopliae*) diferem-se tanto na forma como no tamanho (Figura 7). Os conídios de *M. anisopliae* têm forma de bastonete e os conídios de *A. nidulans* e *A. fumigatus* são esféricos. As médias dos diâmetros dos conídios da linhagem ATCC 10074 de *A. nidulans* e da linhagem CEA 17 de *A. fumigatus* são 3,5 ± 0,4 (n = 30) e 1,75 ± 0,42 µm (n = 30), respectivamente. A média do comprimento do conídio da linhagem ARSEF 324 de *M. anisopliae* var. *acridum* é 8,8 ± 0,7 µm (n = 30), e as médias dos comprimentos dos conídios das linhagens ARSEF 23 e DWR 180 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* são 7,8 ± 1,2 e 8,1 ± 0,9 µm (n= 30), respectivamente.

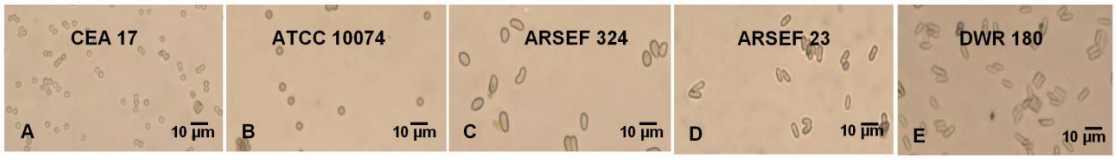

Figura 7. (A) Conídios da linhagem CEA 17 de *Aspergillus fumigatus*, (B) ATCC 10074 de *A. nidulans*, (C) ARSEF 324 de *M. anisopliae* var. *acridum*, (D) ARSEF 23 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e (E) mutante albino DWR 180 de *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

4.1.2 - Efeito da radiação UVB na germinação dos conídios

A germinação dos conídios das linhagens CEA 17 de *A. fumigatus*, ATCC 10074 de *A. nidulans* e ARSEF 324 de *M. anisopliae* var. *acridum* expostos à irradiância de UVB de 1000 mW m^{-2} por 0, 15, 30, 60, e 90 min foi avaliada após períodos de incubação de 6, 12, 24, 36, 48, e 72 h (Figura 8). A maioria das doses foi subletal para as três espécies, exceto as exposições por 60 (3,6 kJ m^{-2}) e 90 min (5,4 kJ m^{-2}), que mataram aproximadamente 7 e 20 % dos conídios de *A. fumigatus*, respectivamente (P = 0.01 and < 0.001, respectivamente). Além de inativarem um fração significativa dos conídios de *A. fumigatus*, as exposições à radiação UVB atrasaram a germinação dos conídios desta espécie por diversas horas (interação entre o tempo de exposição e o período de germinação, P < 0,0001). Também foram observados atrasos, porém menores, nas germinações dos conídios de *A. nidulans* e *M. anisopliae* var. *acridum* expostos à radiação UVB (P < 0.001 para ambas as linhagens).

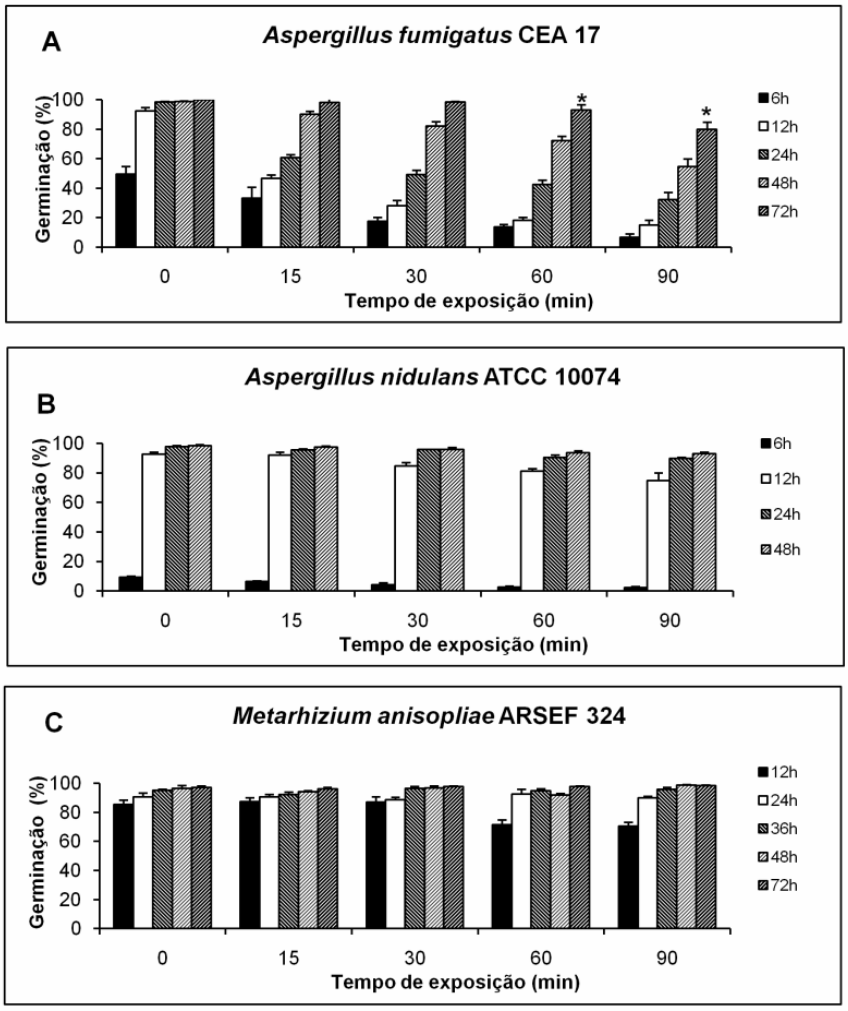

Figura 8. Germinação dos conídios de *A. fumigatus* (A), *A. nidulans* (B) e *M. anisopliae* (B) expostos à radiação UVB (1000 mW m^{-2}) por 15, 30, 60 e 90 min e de controles não expostos à radiação. A germinação foi avaliada após diferentes períodos de incubação. Cada valor é a média de três experimentos independentes e a barra mostra o desvio padrão da média.

A germinação dos conídios da linhagem selvagem ARSEF 23 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e do seu mutante albino DWR 180 após exposição à irradiância de 1000 mW m^{-2} por 0 e 30 min (1,8 kJ m^{-2}) foi avaliada após períodos de incubação de 12, 24, 36, 48, and 72 h (Figura 9). A dose foi subletal para ambas as linhagens (P = 0,47 e 0,21 para as linhagens ARSEF 23 e DWR 180, respectivamente). O atraso na germinação induzido pela radiação foi maior no

mutante albino do que na linhagem selvagem com conídios verdes (interação entre tempo de exposição e períodos de germinação; $P < 0,001$ para ambas as linhagens).

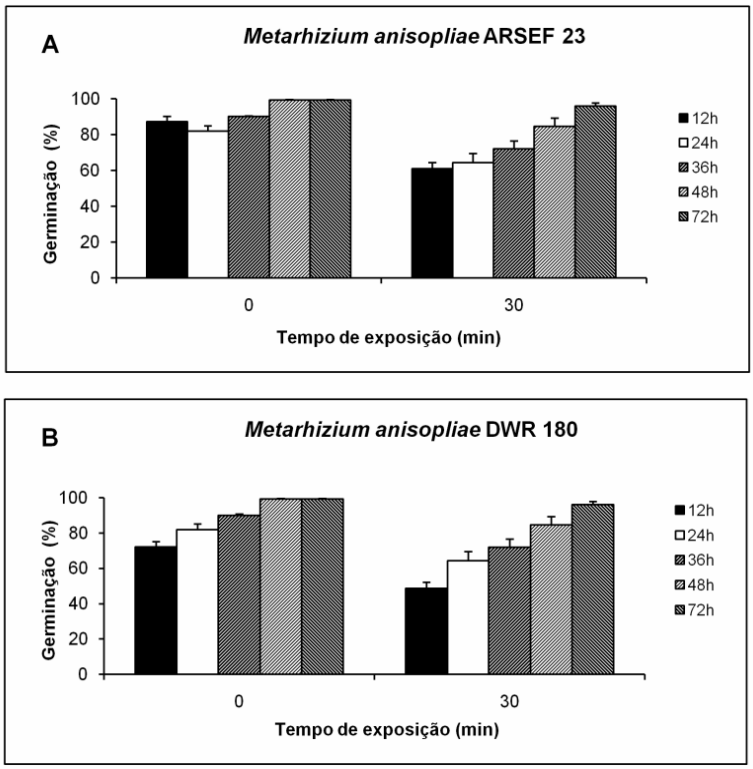

Figura 9. Germinação dos conídios da linhagem selvagem ARSEF 23 de *M. anisopliae* (A) e de seu mutante albino DWR 180, expostos à radiação UVB (1000 mW m^{-2}), por 30 min, e de controles não expostos. A germinação foi avaliada 12, 24, 36, 48 e 72 h após o final da exposição. Cada valor é a média de três experimentos independentes e a barra mostra o desvio padrão da média.

4.1.3 - Quantificação dos CPDs induzidos pela radiação UVB nos conídios da linhagem CEA 17 de *A. fumigatus*, ATCC 10074 de *A. nidulans* e ARSEF 324 de *M. anisopliae* var. *acridum*

A indução de CPDs nos conídios foi dependente da dose. Os resultados da análise densitométrica do DNA, evidenciando o efeito dos diferentes tratamentos, são mostrados nas Figuras 10, 11 e 12.

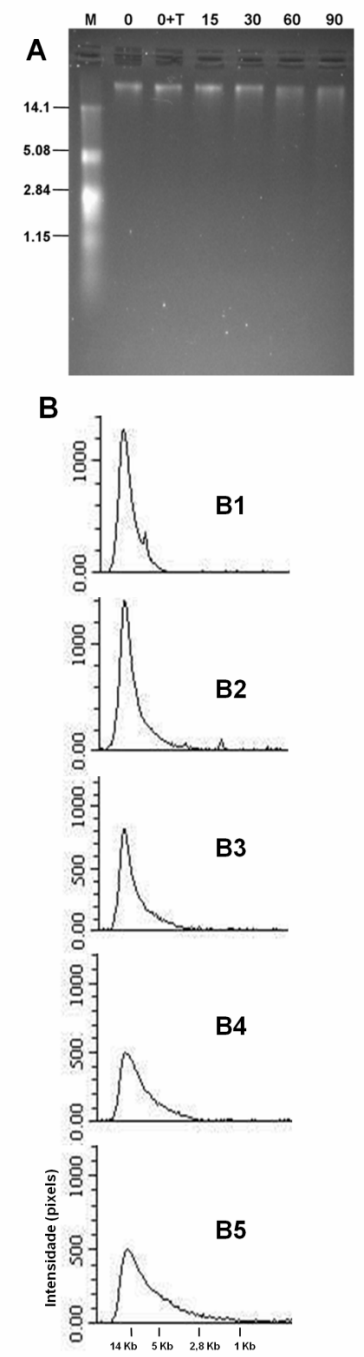

Figura 10. (**A**) Eletroforese em gel de agarose alcalino de DNA extraído de conídios da linhagem ATCC 10074 de *Aspergillus nidulans*. Raias da esquerda para a direita: **M** = marcadores de peso molecular (λPstI); **0** = DNA não exposto e não tratado com a T4 endonuclease V antes da eletroforese; **0+T** = DNA não exposto e tratado com T4 endonuclease V; e **15**, **30**, **60**, **90** = DNAs obtidos de conídios expostos à irradiância de 1000 mWm^{-2} de UVB por 15, 30 60 e 90 minutos e tratado com T4 endonuclease V, respectivamente. (**B**) Padrões de dispersão do DNA extraído dos conídios da linhagem ATCC 10074 de *A. nidulans* expostos a diferentes doses e tratados com a T4 endonuclease V em relação aos marcadores de peso molecular. (**B1**) DNA de conídios não exposto, (**B2**) exposto por 15 min, (**B3**) exposto por 30 min, (**B4**) exposto por 60 min, (**B5**) exposto por 90 min à radiação UVB.

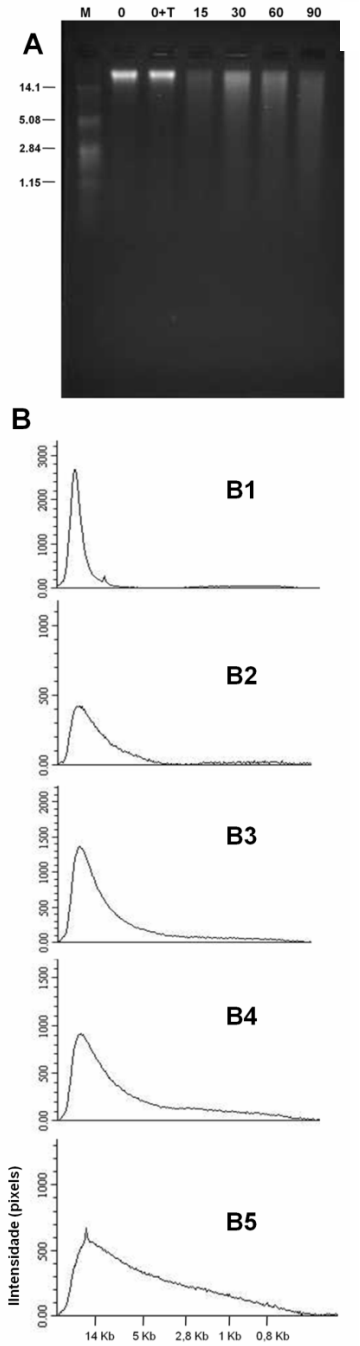

Figura 11. (**A**) Eletroforese em gel de agarose alcalino de DNA extraído de conídios da linhagem CEA 17 de *Aspergillus fumigatus* . Raias da esquerda para a direita: **M** = marcadores de peso molecular (λPstI); **0** = DNA não exposto e não tratado com a T4 endonuclease V antes da eletroforese; **0+T** = DNA não exposto e tratado com T4 endonuclease V; e **15**, **30**, **60**, **90** = DNAs obtidos de conídios expostos à irradiância de 1000 mWm^{-2} de UVB por 15, 30 60 e 90 minutos e tratados com T4 endonuclease V, respectivamente. (**B**) Padrões de dispersão do DNA extraído dos conídios da linhagem CEA 17 de *A. fumigatus* expostos a diferentes doses e tratados com a T4 endonuclease V em relação aos marcadores de peso molecular. (**B1**) DNA de conídios não expostos, (**B2**) exposto por 15 min, (**B3**) expostos por 30 min, (**B4**) expostos por 60 min, (**B5**) expostos por 90 min à radiação UVB.

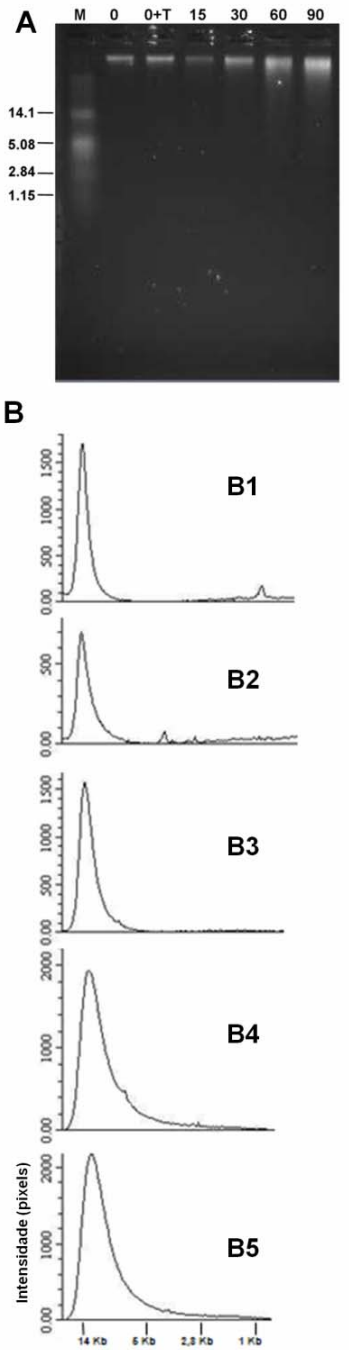

Figura 12. (**A**) Eletroforese em gel de agarose alcalino de DNA extraído de conídios da linhagem ARSEF 324 de *Metarhizium anisopliae*. Raias da esquerda para a direita: **M =** marcadores de peso molecular (λPstI); **0 =** DNA não-exposto e não tratado com a T4 endonuclease V antes da eletroforese; **0+T =** DNA não exposto e tratado com T4 endonuclease V; e **15**, **30**, **60**, **90 =** DNAs obtidos de conídios expostos à irradiância de 1000 mWm^{-2} de UVB por 15, 30 60 e 90 minutos e tratado com T4 endonuclease V, respectivamente. (**B**) Padrões de dispersão do DNA extraído dos conídios da linhagem ARSEF 324 de *M. anisopliae* expostos a diferentes doses e tratados com a T4 endonuclease V em relação aos marcadores de peso molecular. (**B1**) DNA de conídios não expostos, (**B2**) expostos por 15 min, (**B3**) expostos por 30 min, (**B4**) expostos por 60 min, (**B5**) expostos por 90 min à radiação UVB.

As frequências de CPDs (CPDs 10 kb^{-1}) no DNA dos conídios de *A. fumigatus* (CEA 17), *A. nidulans* (ATCC 10074), e *M. anisopliae* var. *acridum* (ARSEF 324) foram estimadas após exposições à irradiância de 1000 mWm^{-2} por 15, 30, 60 and 90 min (Figura 13). O aumento na frequência de CPD no DNA dos conídios foi linear e dependente da dose para as três espécies (r^2 = 0,961, 0,997 e 0,994 para *A. fumigatus*, *A. nidulans* e *M. anisopliae*, respectivamente). Como observado na germinação, o efeito das diferentes doses de UVB foi maior em *A. fumigatus* do que nas outras duas espécies (Figura 13).

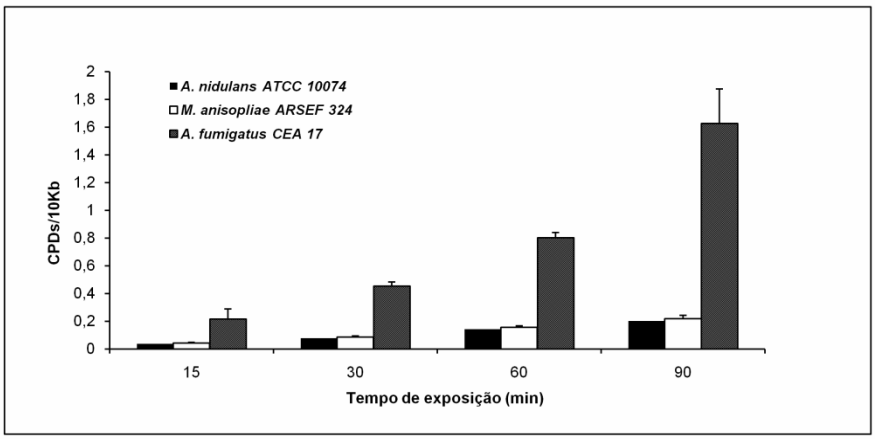

Figura 13. Frequência de dímeros de pirimidina do tipo ciclobutano (CPDs 10 kb^{-1}) nos DNAs de conídios de *A. nidulans* (ATCC 10074), *M. anisopliae* var. *acridum* (ARSEF 324) e *A. fumigatus* (CEA 17) após exposições à irradiância de 1000 mW m^{-2} de UVB por 15, 30, 60 e 90 min. As barras de erro são os desvios padrões de três experimentos independentes.

Espectros de ação são utilizados para que possam ser comparados os resultados de experimentos feitos com diferentes fontes de luz (CALDWELL; FLINT, 1997). As funções biológicas derivadas desses espectros contêm fatores adimensionais que representam a efetividade biológica de cada comprimento de onda. Multiplicando-se esses fatores pela irradiância espectral é possível obter a irradiância biológica efetiva integrada de uma determinada fonte de radiação. Os

espectros de ação têm sido desenvolvidos para muitas respostas biológicas e não biológicas (CALDWEL; FLINT, 1997). É virtualmente impossível comparar os efeitos de diferentes fontes de radiação sem a utilização de um espectro de ação desenvolvido para uma resposta específica (como, por exemplo, indução de CPDs ou sobrevivência) em um determinado sistema biológico. No presente estudo, foi utilizado o espectro de ação para indução de CPDs no DNA, desenvolvido por Quaite et al. (1992), e normalizado para a unidade a 300 nm, para calcular a irradiância de UV. Esse espectro de ação foi selecionado para esse estudo com fungos porque Paul et al. (1997) comparou os espectros de ação mais utilizados e concluiu que o espectro de Quaite foi o que melhor se adequou às diferentes respostas de fungos de diversas espécies à radiação UV. Tanto a irradiância calculada (1000 mWm^{-2}) como as doses (0,9 a 5,4 kJm^{-2}) utilizadas neste estudo podem ser facilmente encontradas no meio ambiente, mesmo em regiões temperadas (BRAGA et al., 2002).

Os ecossistemas terrestres estão passando por transições devido aos efeitos diretos e indiretos do aumento da concentração de CO_2, temperatura, radiação UVB e deflorestação. Os fungos são componentes importantes de praticamente todos os ecossistemas terrestres e têm um papel central nas suas manutenções (MOODY et al., 1999; PAUL et al., 2005). Adicionalmente, existem muitas espécies de fungos que são importantes patógenos de insetos, plantas e humanos. A persistência ambiental e a dinâmica populacional dessas espécies são fortemente influenciadas pela radiação solar (PARNELL et al., 1998; PAUL, 2000; BRAGA et al., 2001a,b,c; BRAGA et al., 2002; RANGEL et al., 2004; PAUL et al., 2005; BRAGA et al., 2006; RANGEL et al., 2006; SCHIAVE et al., 2009).

O entendimento do impacto biológico nos conídios dos danos no DNA, induzidos pela radiação UVB, depende da quantificação precisa desses danos, tanto em experimentos de campo, como em experimentos realizados em laboratório.

No presente estudo, foi verificado que a frequência de CPDs induzidos pela radiação UV no DNA de conídios de *A. nidulans* foi similar à induzida no DNA de conídios de *M. anisopliae* var. *acridum* e que ambas foram maiores do que a frequência induzida nos conídios de *A. fumigatus*. O menor tamanho do conídio de *A. fumigatus* (aproximadamente 1/8 do volume do conídio de *A. nidulans*) e, consequentemente, a menor absorção da radiação UVB antes que ela atinja o núcleo pode ter sido um dos fatores responsáveis pela maior frequência de CPDs nos conídios dessa espécie. Além do tamanho e da forma, outros fatores celulares podem influenciar a intensidade de CPDs e na tolerância à radiação UVB. A tolerância à radiação solar varia muito entre conídios de diferentes espécies. Em geral, espécies com conídios maiores e pigmentados são mais tolerantes do que espécies com conídios menores e hialinos (AL-RUBEAI; EL-HASSI, 1986; IGNOFFO; GARCIA, 1992, BRAGA et al., 2001; CHELICO et al., 2006). A variabilidade na tolerância à radiação solar também é grande entre os isolados da mesma espécie e essas variações podem apresentar variações contínuas e distribuição normal nas diferentes populações (MORLEY-DAVIS et al., 1995; FARGUES et al., 1996, BRAGA et al., 2001). Essa variabilidade reflete na adaptação natural a diferentes condições ambientais. Linhagens de *M. anisopliae* isoladas de sítios onde os níveis ambientais de radiação UV são maiores devido à menor latitude ou ao tipo de vegetação são mais tolerantes à radiação UVB (BRAGA et al., 2001; BIDOCHKA et al., 2001).

As frequências de dano induzido pela radiação UVB observados no presente estudo variaram de 0,04 (dose de 0,9 kJ m^{-2} em *A. nidulans*) a 1,62 CPDs 10 KB^{-1} (dose de 5,4 kJ m^{-2} em *A. fumigatus*). É importante ressaltar que a maioria das doses de UVB utilizadas neste estudo foi subletal para os conídios dos fungos examinados. Chelico et al. (2005) observaram frequências de até 28 CPDs 10 kb^{-1} no DNA de conídios do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* após exposições à radiação UVC (dose de 480 J m^{-2}). Essa intensidade de UVC matou aproximadamente 100% dos conídios.

Tanto no presente estudo, que utilizou UVB, como nos anteriores, que utilizaram UVC, para induzir danos no DNA de conídios, o único fotoproduto avaliado foram os CPDs (CHELICO et al., 2005; CHELICO; KACHATOURIANS, 2008). Até onde sabemos, nenhuma tentativa foi realizada para caracterizar ou quantificar outros fotoprodutos induzidos pela radiação UV no DNA de conídios. Desta maneira, o conhecimento sobre a fotoquímica do DNA de conídios ainda é amplamente desconhecida e estudos adicionais são necessários para identificar e quantificar os outros tipos de lesões no DNA. Os conídios são células extremamente especializadas com características estruturais, fisiológicas e bioquímicas muito diferentes de células metabolicamente ativas (BRAGA et al., 1999; DILLON; CHARNLEY, 1990). Essas diferenças podem influenciar a fotoquímica dos conídios. Outras estruturas especializadas envolvidas na tolerância, como os esporos de bactérias, possuem diferenças marcantes na fotoquímica de seu DNA em relação a células vegetativas (SETLOW, 1995; SLIEMAN; NICHOLSON, 2000; MOELLER et al., 2009). Os efeitos deletérios da radiação UVA e da luz visível nos conídios também precisam ser melhor compreendidos. Foi observado anteriormente que tanto a radiação UVA como a radiação visível, em intensidades facilmente

observadas no meio ambiente, foram capazes de inativar conídios de *M. anisopliae* e de outras espécies de fungos como *Verticillium lecanii* (agora *Simplicillium lanosoniveum*) e *Aphanocladium album* (agora *Lecanicillium aphanocladii*).

4.1.4 - Efeito protetor da pigmentação contra a indução de CPDs em conídios de *M. anisopliae* var. *anisopliae*

As frequências de CPDs nos conídios da linhagem selvagem ARSEF 23 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e nos conídios de seu mutante albino DWR 180 foram estimadas após exposição à irradiância de 1000 mWm^{-2} por 0 e 30 min (Figura 15).

A frequência CPDs no DNA dos conídios mutantes foi dez vezes maior do que nos conídios selvagens com pigmentação verde. Essa é uma forte evidência de que a pigmentação selvagem protegeu o DNA do conídio contra o dano induzido pela radiação UVB.

Os resultados da análise densitométrica do DNA, mostrando os efeitos dos diferentes tratamentos, são mostrados na Figura 14.

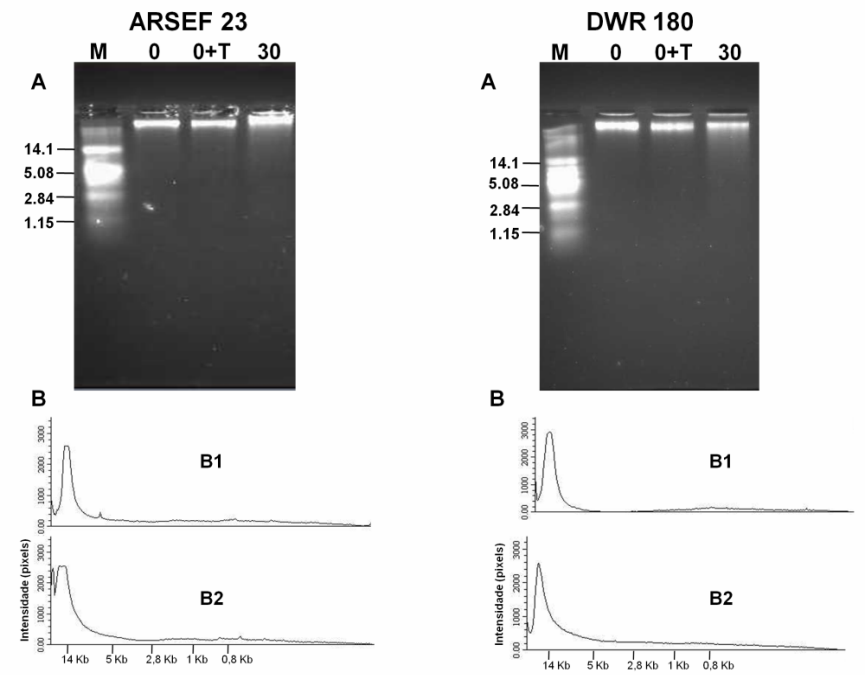

Figura 14. (**A**) Eletroforeses em geís de agarose alcalinos de DNA extraído de conídios das linhagens ARSEF 23 (selvagem) e DWR 180 (mutante albino) de *Metarhizium anisopliae* (esquerda para a direita). Raias da esquerda para a direita: **M** = marcadores de peso molecular (λPstI); **0** = DNA não exposto e não tratado com a T4 endonuclease V antes da eletroforese; **0+T** = DNA não exposto e tratado com T4 endonuclease V; e **30** = DNA obtido de conídios expostos à irradiância de 1000 mWm^{-2} de UVB por 30 minutos e tratado com T4 endonuclease V. (**B**) Padrões de dispersão do DNA extraído dos conídios das linhagens ARSEF 23 e DWR 180 de *M. anisopliae* (esquerda para a direita), expostos a diferentes doses e tratados com a T4 endonuclease V em relação aos marcadores de peso molecular. (**B1**) DNA de conídios não expostos, (**B2**) expostos por 30 min à radiação UVB.

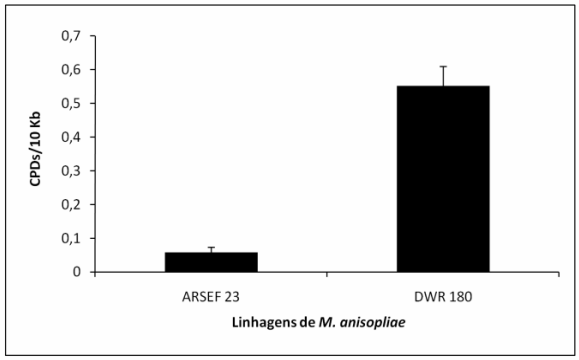

Figura 15. Frequência de dímeros de pirimidina do tipo ciclobutano (CPDs 10 kb^{-1}) em DNA de conídios da linhagem selvagem ARSEF 23 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e no seu mutante albino DWR 180 após exposições à irradiância de 1000 mW m^{-2} de UVB por 0 e 30 min. As barras de erro são os desvios padrões de três experimentos independentes.

A proteção contra a radiação UV depende de características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, incluindo a presença de substância protetoras, sintetizadas durante a conidiogênese. Entre os protetores conhecidos que podem estar presentes nos conídios estão: (1) pigmentos localizados na parede celular que bloqueiam a entrada de radiação (IGNOFFO; GARCIA; BRAGA et al., 2006; RANGEL et al., 2006); (2) enzimas capazes de inativar substâncias tóxicas induzidas pela radiação (MILLER et al., 2004); (3) enzimas, proteínas e metabólitos secundários envolvidos tanto na proteção como no reparo de ácidos nucléicos e outras biomoléculas danificadas pela radiação UV (GOLDMAN; KAFER, 2004; CHELICO et al., 2005; CHELICO et al., 2006; CHELICO; KHACHATORIANS, 2008). Mutantes de *M. anisopliae* com conídios com coloração diferente da coloração esverdeada do tipo selvagem raramente são encontrados na natureza, indicando que a coloração selvagem aumenta a adaptabilidade. Recentemente, nós demonstramos a importância da pigmentação dos conídios de *M. anisopliae* para a tolerância à radiação UVB. De maneira geral, mutantes com conídios brancos foram mais sensíveis à radiação do que mutantes com conídios violetas, que foram mais sensíveis do que mutantes amarelos, que, por sua vez, foram mais sensíveis que a linhagem selvagem ARSEF 23. Conídios do mutante albino DWR 180 (o mutante da linhagem ARSEF 23 utilizado no presente estudo) teve uma sobrevivência dez vezes menor do que a linhagem selvagem após exposição à irradiância de 900 mW m-2 por 2 h (BRAGA et al., 2006). No presente estudo, foi observado que a frequência de dímeros induzidos pela radiação UVB nesse mutante foi aproximadamente dez vezes maior que na linhagem selvagem, explicando, ao menos parcialmente, a menor tolerância do mutante. Essa é a primeira evidência direta mostrando que a pigmentação dos conídios protege o DNA contra os danos induzidos pela radiação UVB.

4.2 - Identificação de genes diferencialmente expressos durante as fases da conidiogênese de A*spergillus fumigatus*

4.2.1 - Desenvolvimento macroscópico e microscópico do fungo

As Figuras 16 e 17 representam a macro e a micromorfologia da linhagem CEA 17 de *Aspergillus fumigatus* durante a conidiogênese. As morfologias macro e micro foram acompanhados simultaneamente para obtermos as fases da conidiogênese do *Aspergillus fumigatus*.

A macromorfologia do *Aspegillus fumigatus* foi realizada em placas de PDAY a 28°C, nos tempos de 16, 20, 24 e 25 h de desenvolvimento. A Figura 16 mostra que as colônias possuem o crescimento rápido, homogêneo e durante o desenvolvimento do fungo, as cores das colônias vão se intensificando até o processo completo da conidiogênese (Figura 16B, C e D).

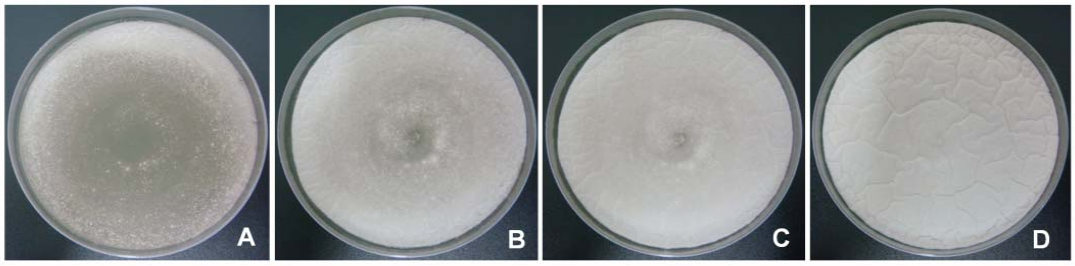

Figura 16. Macromorfologia das fases da conidiogênese de *Aspergillus fumigatus* durante o desenvolvimento do fungo em PDAY a 28 °C. (A) micélio jovem com 16 h mostrando a distribuição uniforme do inóculo de coloração branca, indicando a ausência de conídio, (B) micélio com 20 h mostrando o desenvolvimento uniforme e um leve esverdeado, (C) micélio com 24 h mostrando a intensificação do esverdeado de forma uniforme, (D) micélio com 25 h de desenvolvimento com o completo esverdeamento da placa e uma distribuição homogênea, tendo completado o processo de conidiogênese.

A micromorfologia mostra a formação das principais estruturas envolvidas durante a conidiogênese do *Aspergillus fumigatus,* coradas com lactofenol azul-algodão (Figura 17). Em 0 h de desenvolvimento os conídios não germinados (Figura 17A), em micélio vegetativo com 16 h de desenvolvimento há presença de hifas vegetativas, ramificadas, septadas, incolores e refringentes (Figura 17B), em micélio com 20 h de desenvolvimento há formação da haste simples com uma célula base globlosa na extremidade, chamada de vesícula (Figura 17C), em micélio com 24 h de desenvolvimento há o aparecimento de fiálides que saem da superfície da vesícula com disposição radiada no seu conjunto (Figura 17D), em micélio com 25 h de desenvolvimento nas extremidades das fiálides forma-se uma cadeia de conídios, globosos e pigmentados (Figura 17E).

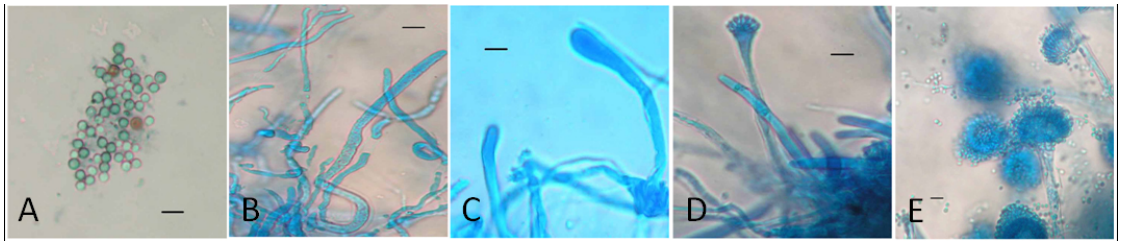

Figura 17. Micrografia mostrando a formação das principais estruturas envolvidas na conidiogênese de *Aspergillus fumigatus* durante o desenvolvimento do fungo. (A) conídios não germinados (0 h de desenvolvimento), (B) micélio jovem com 16 h, (C) micélio com 20 h, mostrando o início da formação da vesícula dos conidióforos, (D) micélio com 24 h, apresentando conidióforos com fiálides e (E) micélio com 25 h, apresentando conidióforos completamente formados e conídios abundantes. Coloração lactofenol azul - algodão.

A partir deste estudo morfológico (macro e micro) foi possível pontuar as fases da conidiogênese do *Aspergillus fumigatus* em três tempos: em 20 h, a fase inicial, em 24 h, a fase intermediária, e em 25 h, a fase tardia da conidiogênese. O controle dos experimentos foi o micélio jovem, ou seja, a célula estava no seu estado vegetativo (16 h).

4.2.2 - Utilização da técnica de *microarray* para a identificação de genes diferencialmente expressos durante as fases da conidiogênese de *Aspergillus fumigatus*

A Figura 18 mostra o delineamento experimental para identificar genes diferencialmente expressos durante as fases da conidiogênese de *Aspergillus fumigatus* (20, 24 e 25 h de desenvolvimento). Foram feitos três experimentos independentes, com a troca de marcação de fluoróforos (*dye swap*) em cada um. No total, foram 18 hibridações.

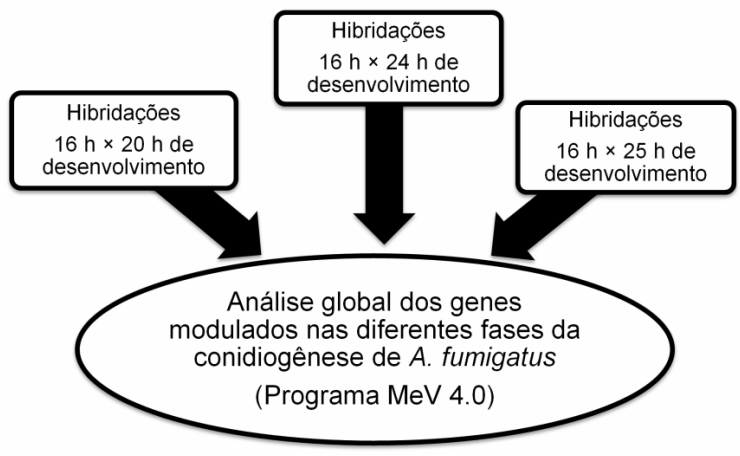

Figura 18. Delineamento experimental das hibridações de *microarray* a partir do tempo de desenvolvimento do *Aspergillus fumigatus*. As hibridações foram realizadas para cada fase da conidiogênese e consistiram de um par de hibridações que combinava um par de RNA de referência marcado com o Cy3 (16 h) ao RNA teste marcado com o Cy5 (20, 24 e 25 h) e por uma segunda hidridação *dye swap.*

O resultado da análise global identificou 2.777 genes modulados, sendo 1.902 genes expressos e 875 genes reprimidos representados na Figura 19. Os genes representados foram obtidos através da determinação de limites de corte dependendo da razão de intensidade de fluorescência das hibridações.

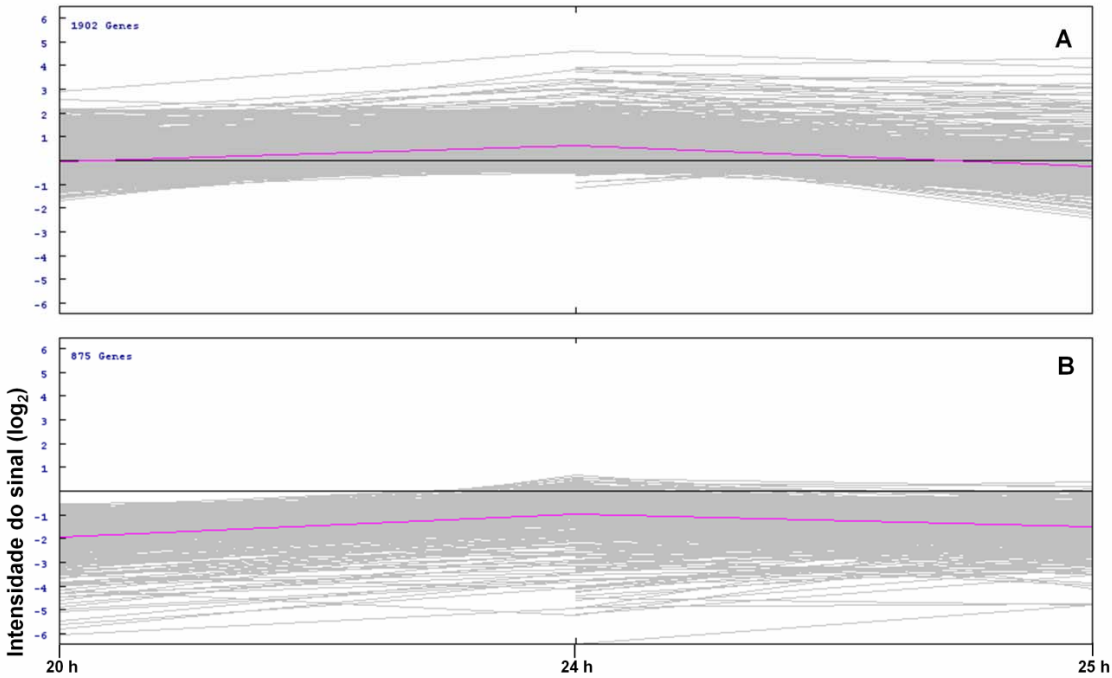

Figura 19. Representação gráfica dos genes modulados nas fases da conídiogênese de *Aspergillus fumigatus*. (**A**) 1. 902 genes expressos e (**B**) 875 genes reprimidos.

Com o Programa Mev foram identificados e listados os genes mais induzidos em cada fase da conidiogênese. Foram considerados diferencialmente expressos os genes que apresentaram diferença na expressão de pelo menos duas vezes em relação ao controle. Estes genes representam 7, 5% do total dos genes validados estatisticamente (Apêndices A, B, C, D, E e F).

4.2.2.1 - Genes diferencialmente expressos durante a fase inicial da conidiogênese de *Aspergillus fumigatus*

Na fase inícial da conidiogênese de *Aspergillus fumigatus* (20 h de desenvolvimento) foi possível identificar 7 genes expressos (APÊNDICE A) e 27 genes reprimidos (APÊNDICE B) que apresentaram diferença na expressão de pelo menos duas vezes em relação ao controle. Os genes mais expressos estão listados na Tabela 3.

Tabela 3. Genes mais significativamente expressos de *Aspergillus fumigatus*, com 20 h de desenvolvimento (início da conidiogênese), em relação ao micélio jovem, com 16 h de desenvolvimento

Locus	Gene N	Log_2(Cy5/Cy3)
Afu1g04620	alcohol dehydrogenase, zinc-containing, putative	2,124993
Afu3g07890	endo alpha-1,4 polygalactosaminidase, putative	1,7573773
Afu5g03780	L-PSP endoribonuclease family protein (Brt1), putative	1,7189598
Afu8g04120	carboxypeptidase S1, putative	1,4245027
Afu5g04270	AMP-binding protein	1,3371499
Afu2g07900	APSES transcription factor (StuA), putative	1,1573
Afu1g02890	dUTPase	1,0027373

Quando foi analisada a lista dos genes mais expressos durante o início da conidiogênese foram selecionados três genes de interresse.

Curiosamente o gene “alcohol dehydrogenase, zinc-containing putative” (*adh*), foi o gene mais expresso nesta fase. O gene *adh* pertence à via de utilização de etanol, que juntamente com outros genes da via realizam a conversão de etanol em acetato, através do acetaldeído (FLIPPHI et al., 2006). A expressão significativa deste gene sugere que o *adh* provavelmente possui outras funções importantes para o desenvolvimento dos fungos.

A “L-PSP endoribonuclease family protein, putative” (*brt1*), está envolvida em processos celulares básicos, pois são proteínas altamente conservadas em procariotos e em eucariotos (MORISHITA et al., 1999). Em *Schizophyllum commune*, o gene *brt1* está ligado à regulação da reprodução sexuada (LENGELER; KOTHE, 1999). A expressão deste gene sugere que a sua função também pode estar relacionada com a reprodução assexuada (conidiogênese) e surge um gene candidato para ser estudado mais profundamente em *A. fumigatus*.

O gene “APSES transcription factor, putative” (*stuA*), foi o principal gene encontrado nesta fase da conidiogênese (início). O gene *stuA* em *A. nidulans*,

Penicillium marneffei e *Fusarium oxysporum* apresenta a função de regular a conidiogênese (ADAMS; WUESER; YU, 1998, VANITTANAKOM et al., 2006, IIDA; OHARA; TSUGE, 2006). Mutações no gene *stuA* resultam na produção de conidióforos extremamente curtos, sem métulas e fiálides. E o conídio é formado na vesícula do conidióforo (ADAMS; WISE; YU, 1999). Este foi o primeiro gene que validou, *in silico* os resultados de "array", sugerindo a confiabilidade dos experimentos.

4.2.2.2 - Genes diferencialmente expressos durante a fase intermediária da conidiogênese de *Aspergillus fumigatus*

Na fase intermediária da conidiogênese de *Aspergillus fumigatus* (24 h de desenvolvimento) foi possível identificar 12 genes expressos (APÊNDICE C) e 89 genes reprimidos (APÊNDICE D), que apresentaram diferença na expressão de pelo menos duas vezes em relação ao controle. Os genes mais expressos estão listados na Tabela 4.

Tabela 4. Genes mais significativamente expressos de *Aspergillus fumigatus*, com 24 h de desenvolvimento (fase intermediária da conidiogênese), em relação ao micélio jovem, com 16 h de desenvolvimento.

Locus ID	Putative or known function	Log_2(Cy5/Cy3)
Afu7g00790	hypothetical protein	1,5248893
Afu1g11670	small nuclear ribonucleoprotein (LSM8), putative	1,3472321
Afu2g16550	conserved hypothetical protein	1,2594051
Afu3g13080	hypothetical protein	1,2070249
Afu3g00730	conserved hypothetical protein	1,1514648
Afu3g03470	hypothetical protein	1,1396383
Afu3g13130	HHE domain protein	1,1282908
Afu8g05040	dihydrodipicolinate synthetase family protein	1,0922061
Afu3g09830	conserved hypothetical protein	1,0497574
Afu4g03870	ELL complex EAP30 subunit	1,0432262

Incialmente, foi selecionado os genes que codificam as proteínas hipotéticas que apresentaram uma maior expressão (Afu7g00790 e Afu2g16550). Nesta fase foi observado grande número de proteínas hipotéticas (Tabela 4), sugerindo que ainda há muitos estudos necessários para a sua melhor compreensão. Um gene encontrado de grande importância foi "scytalone dehytratase", produto do gene *arp 1*. Apesar deste gene não está presente no Apêndice C, pois ele obteve sua expressão de 1,81 vez, ele foi selecionado, pois é um dos principais na conidiogênese. Como é sabido, o gene *arp 1* com os genes *alb1* e *arp2* têm a função de regular a biossíntese de pigmentação e são encontrados em apenas fungos escuros (TSAI et al., 1999). Em *A. fumigatus*, a inativação do gene *arp1* resulta na alteração da cor do conídio, de verde escuro para rosa avermelhado (TSAI et al., 1997). Como a pigmentação ocorre durante a conidiogenêse, fica evidente que este é o segundo gene que valida *in silico* estes resultados.

4.2.2.3 - Genes diferencialmente expressos durante a fase tardia da conidiogênese de *Aspergillus fumigatus*

Na fase tardia da conidiogênese de *Aspergillus fumigatus* (25 h de desenvolvimento), foi possível identificar 8 genes expressos (APÊNDICE E) e 68 genes reprimidos (APÊNDICE F), que apresentaram diferença na expressão de pelo menos duas vezes em relação ao controle. Os genes mais expressos estão listados na Tabela 5.

Tabela 5. Genes mais significativamente expressos de *Aspergillus fumigatus*, com 25 h de desenvolvimento (final da conidiogênese), em relação ao micélio jovem, com 16 h de desenvolvimento.

Locus ID	Putative or known function	Log_2(Cy5/Cy3)
Afu2g13590	hypothetical protein	1,7567014
Afu5g00100	hypothetical protein	1,6391805
Afu2g01040	formaldehyde dehydrogenase	1,5382175
Afu1g04750	cyclin	1,4127584
Afu2g11790	conserved hypothetical protein	1,2857565
Afu5g06680	4-aminobutyrate aminotransferase	1,184831
Afu7g04640	conserved hypothetical protein	1,1097534
Afu5g05790	ubiquitin ligase subunit HrtA, putative	1,0608356

Na fase tardia da conidiogênese, o gene selecionado foi o gene “bifunctional catalase-peroxidase *cat2*”. Este não foi uns dos genes mais significamente expressos (Tabela 5). Apesar do *cat2* estar baixamente expresso (1, 39 vez), ele foi selecionado pois o produto deste gene é um fator de virulência em *Aspegillus nidulans* e em *Aspegillus fumigatus* (REMENTERIA et al., 2005; RONNING et al., 2005; SHIBUYA et al., 2006). Este gene pertencente à família das catalases, enzimas responsáveis pela decomposição da água oxigenada em água e oxigênio para a detoxificação da célula (REMENTERIA et al., 2005; RONNING et al., 2005; SHIBUYA et al., 2006). O gene *cat2* apresentou sua expressão menor que duas vezes em relação ao controle, mas a expressão foi significativa, pois na fase intermediária da conidiogênese este fator de virulência apareceu reprimido (- 2,6 vezes) (APÊNDICE F). Isto pode sugerir que os fatores de virulência são expressos tardiamente no processo de conidiogênese, sinalizando a importância dos fatores de virulência e patogenicidade na produção e dispersão dos conídios.

4.2.3 - Validação da expressão de genes expressos identificados no *microarray* de conidiogênese por RT-PCR em tempo real.

A Figura 20 mostra o perfil de expressão de cada gene utilizado para validar os experimentos de *microarray* durante as fases da conidiogênese. A validação foi realizada com os sete genes de interesse selecionados anteriormente mais um gene utilizado como referência.

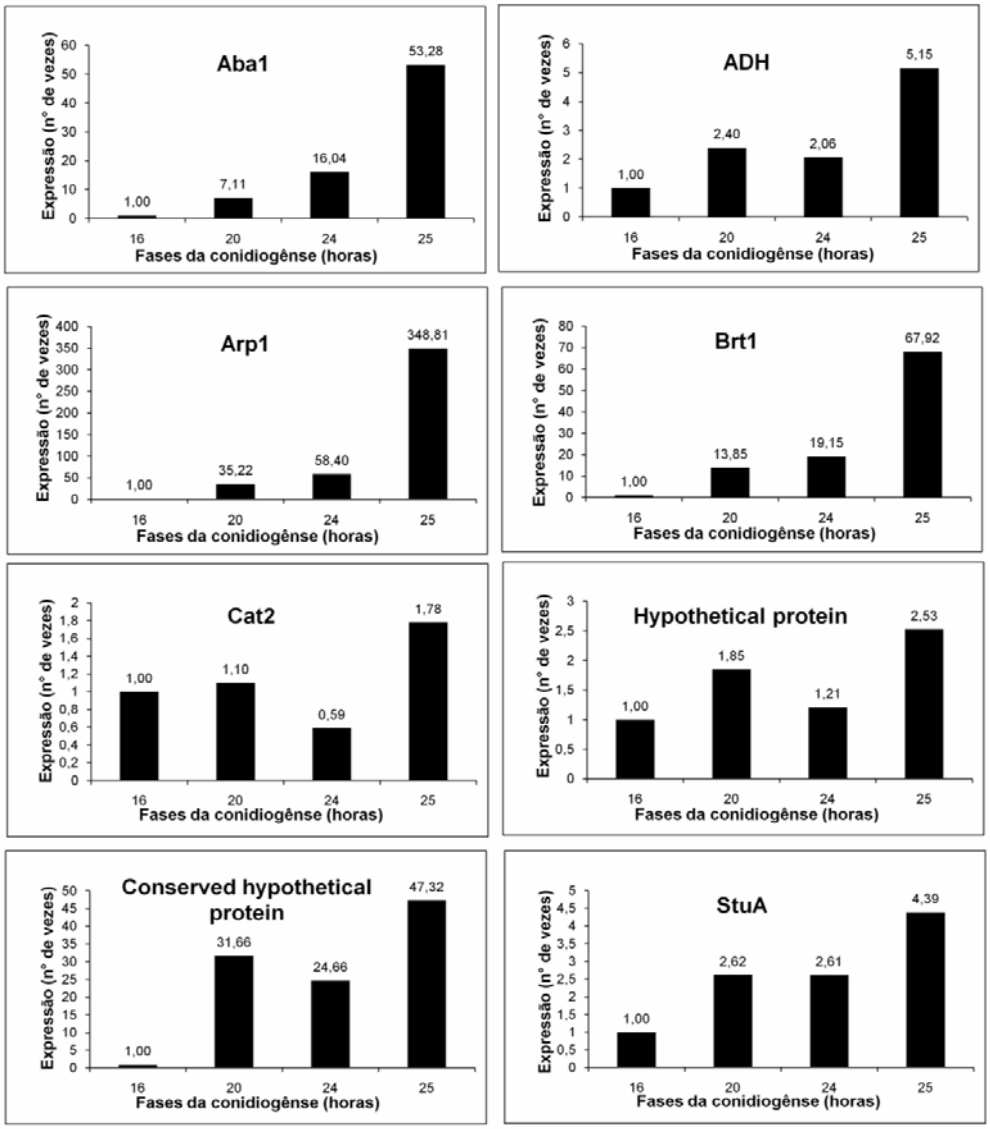

Figura 20. Perfil de expressão dos genes *aba1*, *adh*, *arp1*, *brt1*, *cat2*, proteína hipotética, proteína hipotética conservada e *stuA* durante as fases da conidiogênese de *Aspergillus fumigatus* avaliado por RT PCR em tempo real. Os valores representam o número de vezes que o gene foi expresso em comparação ao micélio jovem (16 h de desenvolvimento).

O gene *aba1* não foi validado estatísticamente nos experimentos de *microarray*, mas foi foi incluso para ser utilizado como referência para avaliar a expressão nos experimentos. O gene *aba1* codifica uma proteína que contem o domínio ATTS de ligação ao DNA, que por sua vez, é requerido nos estágios terminais do desenvolvimento do conidióforo (ANDRIANOPOULUS e TIMBERLAKE, 1994). O gene *aba1* foi utilizado como um gene marcador para validar as populações de cDNA dos 3 experimentos independentes. O gene *aba1* apresentou uma expressão acentuada na fase tardia da conidiogênese. Em 20 h tivemos uma expressão de 7,11 vezes, seguida de 16,04 vezes em 24 h e subindo para 53,28 vezes em 25 h, validando, assim, as populações de cDNA extraído em três experimentos independentes.

O gene *stuA* atua na regulação da conidiogênese em fungos filamentosos (ADAMS; WUESER; YU, 1998, IIDA; OHARA; TSUGE, 2006; MILLER, 1992; SHEPPARD et al., 2005; VANITTANAKOM et al., 2006). Este gene apresentou expressões significativas ao longo de todo desenvolvimento, sendo 2,62 vezes expresso em 20 h, 2,61 vezes em 24 h e 4,39 vezes expresso em 25 h. Estes resultados mostram que o *stuA* está mais expresso no final da conidiogênese (25h), pois neste momento há a completa formação dos conidióforos. O gene *stuA* ("stuntet A"), pertence ao domínio APSES (ASM-1, *Phd-1*, *StuA*, EFGTF-1 e *Sok2*) que definem um grupo de proteínas pertencentes a uma família relacionada a fatores de transcrição no controle de desenvolvimento fúngico (ARAMAYO et al., 1996). Miller, Wu e Miller (1992) avaliaram a expressão do *stuA* em *A. nidulans*, os autores relataram que sua expressão é complexa e mais estudos são necessários para compreender melhor o processo conidiogênico. Eles observaram que a expressão dos genes envolvidos na conidiogênese (*abaA*, *brlA*, *medA* e *stuA*) são dependentes entre si. Dutton et al. (1997) sugeriram que durante o desenvolvimento multicelular do conidióforo em *A. nidulans*, a

proteína *StuA* regula ativamente este processo. Em 2007, Breakspear e Momany identificaram que o *stuA* não está somente relacionado na conidiogênese, mas também durante o início do crescimento vegetativo em *A. nidulans*. Quando o gene *stuA* foi inativado em *A. fumigatus,* observou-se a reprodução assexuada bastante prejudicada, mostrando uma morfologia do conidióforo notadamente anormal. Apenas um pequeno número de conídios anormais foi produzido e com germinação precoce (SHEPPARD et al., 2005). Os resultados do gene *stuA* encontrados neste trabalho foram validados, pois está coerente com a literatura.

O gene *arp1* atua na regulação da biossíntese de pigmentos em fungos filamentosos (BERNARD; LATGÉ, 2001; LATGÉ, 2001; TSAI et al., 1997; TSAI et al., 1999). Este gene foi validado, pois apresentou expressões significativas, sendo de 35,22 vezes expresso em 20 h, 58,4 vezes em 24 h e 348,81 vezes expresso em 25 h. Este resultado mostra que o gene esteve expresso ao longo de todo o desenvolvimento e que são mais expressos no final do processo conidiogênico. O gene *arp 1* com os genes *alb1* e *arp2* têm a função de regular a biossíntese de pigmentação e está diretamente relacionado com a patobiologia de *Aspergillus fumigatus* (LATGÉ, 2001). Tsai et al. (1997) mostraram que a interupção do gene *arp1* de *A. fumigatus* resultou na alteração da cor do conídio de verde escuro para rosa avermelhado e que os esses mutantes exibiram uma elevada capacidade de se ligar ao C3 (componente do sistema complemento), quando comparado com a linhagem selvagem. Os autores mostraram que a expressão deste gene está relacionada com a biossíntese de pigmentos e também está diretamente relacionada com a proteção da célula contra o sistema complemento.

Outro estudo realizado por Tsai et al. (1999) sugerem que a biossíntese de pigmentos em *A. fumigatus* é mais complexa do que a via de melanização, pois

mesmo com mutações nos seis genes da via de melanização (*alb1*, *arp1*, *arp2*, *abr1*, *abr2* e *ayg1*) foi possível identificar o acúmulo de produtos necessários para a pigmentação. Bernard e Latgé (2001) mostraram que uma mutação na via da melanização induz uma modificação ou reorganização na parede celular. Os conídios brancos de *Aspergillus fumigatus* apresentaram uma superfície lisa quando comparados aos conídios da linhagem selvagem que possuem uma densa camada de pigmentos. Os autores relataram que a parede celular de *A. fumigatus* tem um papel essencial nas mudanças morfogênicas associadas com o ciclo celular deste fungo (conidiogênese). Assim, fica evidente que são necessários muitos estudos para elucidar a biossíntese dos pigmentos e os resultados deste trabalho contribuirão para avaliar a sua importância na proteção da célula de *A. fumigatus*.

O gene *brt1* apresentou uma expressão exponencial, sendo 13,85 vezes em 20 h, 19,15 vezes em 24 h e 67,92 vezes expressa em 25 h. A função deste gene ainda é desconhecida. Apenas os autores Lengeler e Kothe (1999) sugeriram que o *brt1* está ligado à regulação da reprodução sexuada do fungo *Schizophyllum commune*. Portanto, os resultados da expressão deste gene neste estudo sugerem que a sua função pode estar relacionada com a reprodução assexuada (conidiogênese), e surge um gene candidato para ser estudado mais profundamente em *A. fumigatus*.

O gene *cat2* está relacionado com um fator de virulência em *Penicillium marneffei* (PONGPOM et al., 2005), *Neurospora cras*sa (PERAZA; HANSBERG, 2002), *Aspegillus nidulans* (NOVENTA-JORDÃO et al., 1999) e *Aspegillus fumigatus* (PARIS et al., 2003; REMENTERIA et al., 2005; RONNING et al., 2005). O gene *cat2* apresentou uma senvível expressão em 25 h (1,78). Este gene foi validado pois apresentou a mesma modulação encontrada no *microarray*, ou seja, reprimido em 24 h e expresso em 25 h. Paris et al. (2003) mostraram que as catalases em micélio

protegem o fungo do hospedeiro. Micélios do duplo mutante (*Δcat1Δcat2*) apresentaram um aumento na sensibilidade para água oxigenada e foram mais sensíveis aos neutrófilos polimorfonuceares, quando comparados com o micélio da linhagem selvagem. Sendo assim, os resultados encontrados neste trabalho sugerem que os fatores de virulência são requeridos no final da conidiogênese.

O gene *adh* pertence à via de utilização de etanol, que com a ajuda de outros genes realizam a conversão de etanol em acetato via acetaldeído em *A. nidulans* (FLIPPHI et al, 2006). Kniemeyer et al. (2006) identificaram as proteínas relacionadas na via de degradação do etanol em *A. fumigatus*. Este gene foi validado, pois também apresentou expressão em 20 h (2,40 vezes) como nos experimentos com *microarray*. Curiosamente também apresentou um discreto declínio na expressão em 24 h (2,06 vezes) e sua maior expressão foi em 25 h (5,15). Estes resultados sugerem que o gene *adh* pode possuir outra função, ainda desconhecida, relacionada com a conidiogênese.

O gene que codifica uma “hypothetical protein” apresentou uma discreta expressão, 1,85 vezes em 20 h, 1,21 vezes em 24 h e 2,53 vezes expresso em 25 h, sugerindo estar relacionada a processos celulares basais, pois estava presente em todo o desenvolvimento com baixos níveis expressão. Este gene foi validado, pois nos experimentos com o *microarry* também apresentou expressão em 24 h de desenvolvimento (fase intermediária da conidiogênese).

Um gene que codifica uma “conserved hypothetical protein” apresentou altos níveis de expressão durante toda a conidiogênese, sendo mais expresso em 20 h (31,66) e em 25 h (47,32), como encontrado no *microarray*. Estes resultados sugerem que este gene pode ser um novo alvo gênico e poderá ser utilizado como marcador para a conidiogênese.

4.3 - Identificação de genes modulados por exposições subletais à radiação UVB em micélio de *A. fumigatus*

4.3.1 - Utilização da técnica de *microarray* para a identificação de genes modulados por exposições subletais à radiação UVB em micélio de *A. fumigatus*

A Figura 21 mostra o delineamento para identificar genes diferencialmente expressos após exposições subletais à radiação UVB em micélio de *A. fumigatus*. O micélio jovem do fungo (16 h de desenvolvimento em meio PDAY) foi exposto à irradiância de 1000 mWm^{-2} de UV por 30 minutos. Os transcriptomas obtidos imediatamente após o final da exposição e os transcriptomas de micélios mantido no escuro por 30 min após à irradiação (período de recuperação no escuro) foram comparados com o transcriptoma de micélio não exposto à radiação UV.

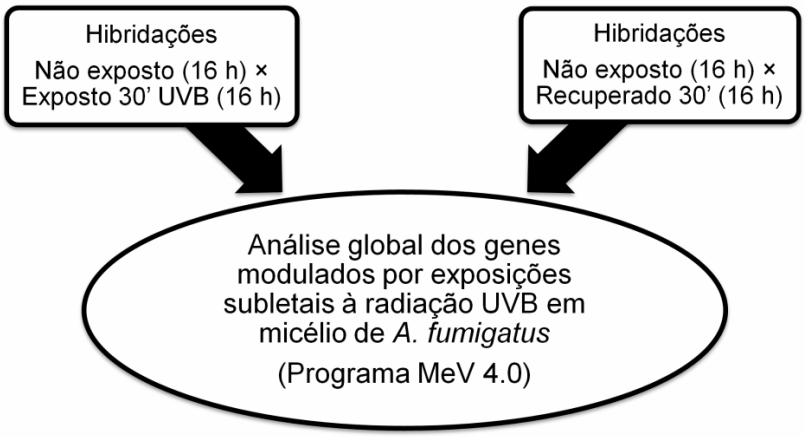

Figura 21. Delineamento experimental das hibridações de *microarray* a partir de exposições subletais à radiação UVB em micélio de Aspergillus fumigatus. As hibridações foram realizadas com o micélio exposto à radiação UVB por 30 min e após 30 min de recuperação no escuro. Estas condições consistiram de um par de hibridações que combinava um par de RNA de referência marcado com o Cy3 (micélio não exposto) ao RNA teste marcado com o Cy5 (micélio exposto e recuperado) e por uma segunda hidridação *dye swap.*

O resultado da análise global identificou 2.497 genes modulados, sendo 1.363 genes expressos e 1.134 genes reprimidos representados na Figura 22. Os genes representados foram obtidos através da determinação de limites de corte dependentes da razão de intensidade de fluorescência das hibridações.

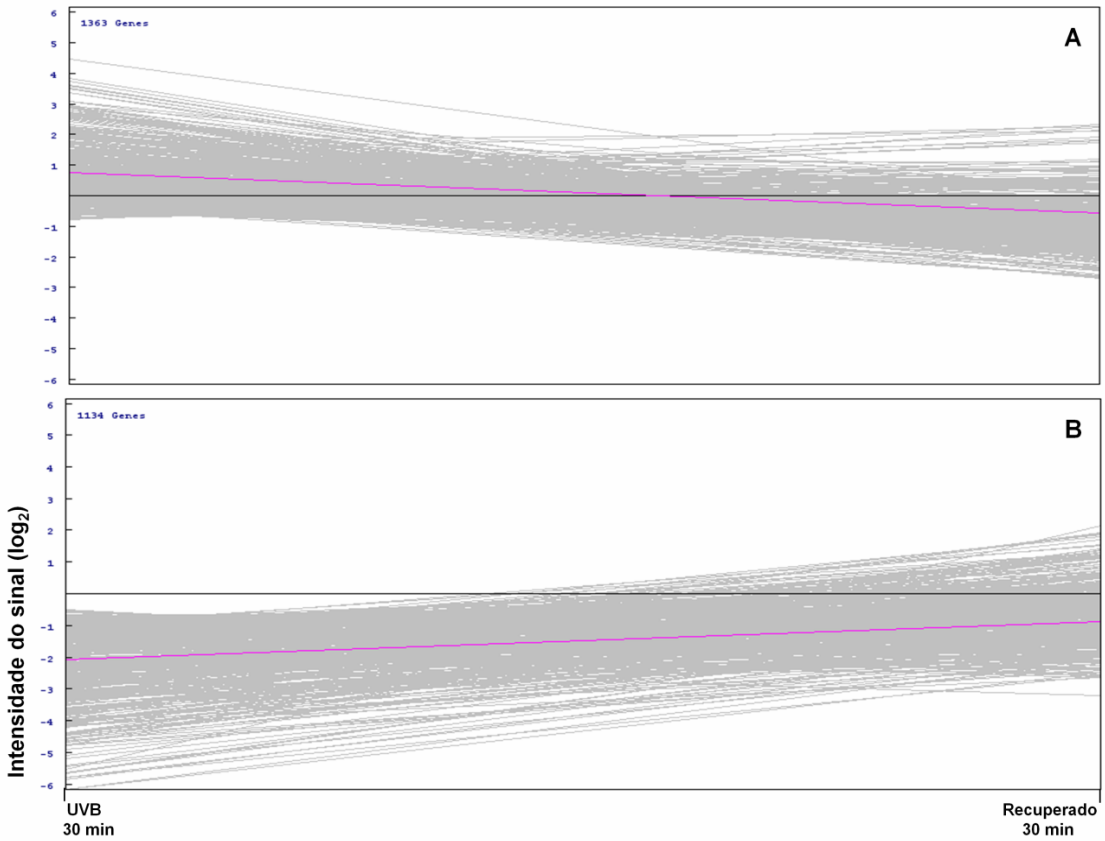

Figura 22. Representação gráfica dos genes modulados por exposições subletais à radiação UVB em micélio de *Aspergillus fumigatus*. (**A**) 1. 363 genes expressos e (**B**) 1.134 genes reprimidos.

Com o Programa Mev foram identificados e listados os genes mais induzidos na exposição e na recuperação após a exposição do micélio de *A. fumigatus*. Foram considerados diferencialmente expressos os genes que apresentaram diferença na expressão de pelo menos duas vezes em relação ao controle, estes genes representam 20,8 % do total dos genes validados estatisticamente (Apêndices G, H, I e J).

4.3.1.1 - Genes diferencialmente modulados no micélio jovem de *Aspergillus fumigatus*, exposto à radiação UVB

Nos experimentos de *microarray* do micélio jovem de exposto à radiação UVB foi possível identificar 51 genes expressos (APÊNDICE G) e 50 genes reprimidos (APÊNDICE H), que apresentaram diferença na expressão de pelo menos duas vezes em relação ao controle. Os genes mais expressos estão listados na Tabela 6.

Tabela 6. Genes mais significativamente expressos de *Aspergillus fumigatus*, exposto à radiação UVB (1000 mW m^{-2}) por 30 min.

Locus ID	Putative or known function	Log_2(Cy5/Cy3)
Afu4g06970	RADC	3,9660223
Afu7g05080	C6 transcription factor, putative	3,9000983
Afu6g04490	camp independent regulatory protein	3,8712232
Afu1g03110	ribosomal protein L29/heparin/heparan sulfate interacting protein	3,8464594
Afu5g05630	hypothetical protein	2,9150112
Afu6g02750	nascent polypeptide-associated complex (NAC) subunit, putative	2,8357046
Afu6g09335	SRF-type transcription factor family protein	2,8034453
Afu2g08130	ribosomal protein L41	2,6678462
Afu2g05950	snRNP and snoRNP protein (Snu13), putative	2,658221
Afu8g06820	hypothetical protein	2,6071537

O gene que apresentou a mais significante expressão em relação ao micélio não exposto foi o *rad*C (Tabela 6). Este gene pertence a uma família descrita na literatura como um importante gene no reparo ao dano no DNA de *A. nidulans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cereviseae* e *Schizosaccharomyces pombe* (GOLDMAN; McGUIRE; HARRIS, 2002). Mutação neste gene causa um dramático aumento em mutações espontâneas na célula (GOLDMAN; McGUIRE; HARRIS, 2002). Esse resultado foi de grande importância, pois validou, *in silico* este *microarray* de *A. fumigatus*.

Outro gene selecionado foi o “bifunctional catalase-peroxidase *cat2*”. Não foi um dos genes mais significamente expressos, mas está listado no Apêndice G (4,22 vezes). Este gene que pertence à família das catalases e está relacionado com fator

de virulência em *Aspergillus fumigatus* e *Aspegillus nidulans* (REMENTERIA et al., 2005; RONNING et al., 2005; SHIBUYA et al., 2006). *O cat2* foi expresso quando exposto à radiação UVB por 30 min, sugerindo que este fator de virulência também atua quando a célula está sob estresse.

Nos genes reprimidos foi observada a presença do gene *cdc25,* gene chave na regulação do ciclo celular em *Aspergillus nidulans* (CRENSHAW et al., 1998; MOMANY, 2002). Este resultado indica que este gene pode estar envolvido no atraso no desenvolvimento da célula, quando ela está sob estresse, permitindo o reparo dos danos gerados pela radiação UVB.

4.3.1.2 - Genes diferencialmente modulados no micélio jovem de *Aspergillus fumigatus*, recuperado no escuro após exposição à radiação UVB

Nos experimentos de *microarray* do micélio jovem de *A. fumigatus* recuperado no escuro (30 min) após exposição à radiação UVB (30 min) foi possível identificar 51 genes expressos (APÊNDICE I) e 367 genes reprimidos (APÊNDICE J), que apresentaram diferença na expressão de pelo menos duas vezes em relação ao controle. Os genes mais expressos estão listados na Tabela 7.

Tabela 7. Genes mais significativamente expressos de *Aspergillus fumigatus*, após 30 min de recuperação no escuro, depois da exposição à radiação UV por 30 min.

Locus ID	Putative or known function	Log_2(Cy5/Cy3)
Afu6g06470	heat shock protein, class I	3,6515033
Afu2g12630	allergen Asp F13	2,779333
Afu4g04280	AN1 zinc finger protein	2,6910534
Afu6g10470	zinc finger protein ZPR1	2,362108
Afu5g01650	bZIP transcription factor (JlbA), putative	2,3336928
Afu8g01710	antigenic thaumatin domain protein, putative	2,300082
Afu2g13060	calcineurin binding protein, putative	2,1820326
Afu6g04750	conserved hypothetical protein	2,1599524
Afu2g01720	hypothetical protein	2,1316307
Afu3g03060	cell wall protein (PhiA), putative	2,1278272

O gene selecionado para validação na recuperação foi uma “heat shock protein”, classe I (*hsp30*). Em *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* e em *Penicillium marneffei*, as HSPs são uma classe de proteínas expressas na resposta ao choque térmico. Funcionam como as chaperonas moleculares, tiveram suas sequências conservadas ao longo do tempo e ajudam a proteger da desnaturação de proteínas irreversíveis (ABRASHEV et al., 2008; DO;YAMAGUCHI, MIYANO, 2009;; VANITTANAKOM et al., 2009). Este resultado infere que a *hsp30* responde contra o estresse oxidativo gerado pela radiação UVB.

4.3.2 - Validação da expressão de genes expressos identificados no *microarray* por *Real-time RT-PCR*

A Figura 23 mostra o perfil de expressão de cada gene utilizado para validar os experimentos de *microarray* do micélio jovem de *A. fumigatus* recuperado no escuro (30 min) após exposto à radiação UVB (30 min). A validação foi realizada com os quatro genes de interesse selecionados anteriormente.

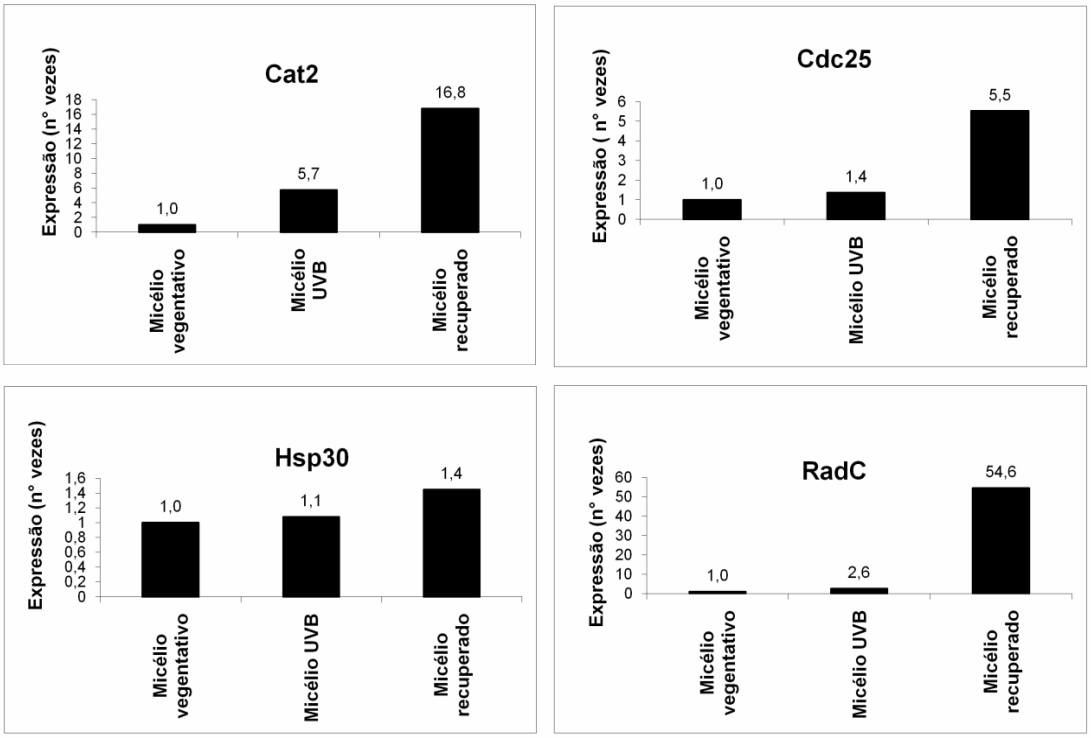

Figura 23. Perfil de expressão dos genes *cat2*, *cdc25*, *hsp30* e *radC* durante exposições subletais à radiação UVB e após 30 min de recuperação no escuro em micélio de *Aspergillus fumigatus* avaliado por RT PCR em tempo real. Os valores representam o número de vezes que o gene foi expresso em comparação com o micélio vegetativo.

O gene *radC* pertence a uma família descrita na literatura como um importante gene no reparo ao dano no DNA de fungos filamentosos (GOLDMAN; McGUIRE; HARRIS, 2002). O *radC* é um homólogo do gene *rad52* em humanos. Este gene, juntamente com o *rad51*, também está envolvidos no reparo da quebra de dupla fita em *S. cereviseae* por recombinação homóloga (CHAN; SCHIESTL, 2009). Este gene foi o mais expresso nos experimentos de *microarray* de micélio exposto à radiação UVB. Nos experimentos de RT-PCR em tempo real, o gene *radC* foi validado, pois apresentou a expressão de 2,6 vezes no micélio exposto à radiação UVB e um aumento bastante significativo de 54,6 vezes na recuperação no escuro por 30 mim (ver Figura 23). Estes resultados sugerem que mesmo com um estresse moderado, após a exposição subletal à radiação UVB (30 mim), o reparo ao

dano no DNA aumenta significamente para a célula se reestruturar e continuar seu desenvolvimento.

O gene *cat2* está relacionado com fatores de virulência em *Aspergillus fumigatus* (PARIS et al., 2003; REMENTERIA et al., 2005; RONNING et al., 2005) e estava expresso no *microarray* de micélio exposto à radiação UVB. Nos experimentos de RT PCR em tempo real, este gene também foi validado, pois apresentou uma expressão significativa de 5,7 vezes no micélio exposto e um aumento de 16,8 vezes no micélio recuperado. Como descrito anteriormente, Paris et al. (2003) mostraram que micélios do duplo mutante (*Δcat1Δcat2*) apresentaram um aumento na sensibilidade para água oxigenada e foram mais sensíveis aos neutrófilos polimorfonuceares, quando comparados com o micélio da linhagem selvagem. Rementeria et al. (2005) e Ronning et al. (2005) em suas revisões de virulência de *A. fumigatus* relataram que o *cat2* é a segunda catalase micelial com alta sensibilidade ao calor e com atividade de peroxidase e que estas enzimas protegem o fungo das espécies reativas de oxigênio (ROS). Como a radiação UVB é um indutor de ROS, os resultados encontrados neste trabalho sugerem que o *cat2* pode estar atuando como protetor ao estresse gerado e ter um importante papel na recuperação do fungo.

O gene *hsp30* pertence à classe das HSPs, que são proteínas expressas na resposta ao estresse térmico ou ajudam a proteger da desnaturação de proteínas irreversíveis (VANITTANAKOM et al., 2009; DO; YAMAGUCHI; MIYANO, 2009). Este gene apresentou expresso no *microarray* do micélio recuperado e nos experimentos de RT PCR em tempo real. O gene *hsp30*, apresentou pouca expressão sendo 1,1 vez no micélio exposto e 1,4 vez no micélio recuperado.

Vanittanakom et al. (2009) caracterizaram o gene *hsp30* em *Penicillium marneffei* e sugeriram que a Hsp30 pode desempenhar um papel na reposta ao estresse e/ou no processo de diferenciação celular deste fungo. Do, Yamaguchi e Miyano (2009) avaliaram os mecanismos de adaptação térmica do fungo *A. fumigatus* e sugeriram que as proteínas “heat shock” podem regular os genes metabólicos. Apesar da baixa expressão do gene *hsp30* nos resultados obtidos, estes resultados sugerem que o *hsp30* foi modulado mesmo com um estresse oxidativo moderado (30 mim de exposição à radiação UVB) para proteger a célula, além de ser sabidamente constitutivo.

A fosforilação de proteínas reversíveis é um importante mecanismo regulatório do controle do ciclo celular, no qual as proteínas fosfatases interagem na atividade das proteínas quinases. Em *A. nidulans*, a proteína Cdc25 é um tipo de fosfatase bem conhecido na sua essencial função de regular o ciclo celular (ROBERTSON; FINK, 1998; PAN; HEITMAN, 1999).

A expressão do gene *cdc25* foi de 1,4 vez no micélio exposto e um aumento de 5,5 vezes no micélio recuperado. Apesar de estar reprimido nos experimentos de *microarray* (exposição à radiação UVB), ele foi validado, pois apresentou baixa expressão nos experimentos de RT PCR em tempo real e o aumento da expressão na recuperação sugere que nos 30 min após a exposição há um incío na atividade do ciclo celular.

5 - Conclusões

5 - CONCLUSÕES

5.1 - É possível quantificar CPDs através de eletroforese quantitativa em gel de agarose alcalino nos conídios de *A. fumigatus, A. nidulans e M. anisopliae*.

5.2 - Os aumentos nas frequências de CPDs foram lineares e diretamente proporcionais às doses nos conídios das três espécies de fungos.

5.3 - A frequência de CPDs foi aproximadamente dez vezes maior nos conídios albinos de *M. anisopliae* do que nos conídios selvagens, permitindo concluir que a pigmentação dos conídios é capaz de proteger o DNA contra os efeitos deletérios da radiação UVB.

5.4 - Foram identificados dezenas de genes diferencialmente expressos durante as fases da conidiogênese de *A. fumigatus*. Alguns dos genes identificados já haviam sido associados ao processo, entretanto a maioria dos genes identificados não possui função conhecida, o que demonstra o grande potencial desse estudo para a caracterização de novos genes associados à conidiogenese.

5.5 - Foram identificados dezenas de genes diferencialmente expressos ao final de exposições subletais à radiação UVB e dezenas de genes diferencialmente expressos 30 min após o final das exposições, em micélio jovem de *A. fumigatus*. Alguns dos genes que apresentaram aumento na transcrição, como o gene *radC*, já havia sido associado à resposta celular aos danos induzidos pela radiação, entretanto a maioria dos genes identificados não apresenta função conhecida, o que demonstra o grande potencial desse estudo para a identificação de genes envolvidos na resposta do fungo à radiação.

6 - Referências Bibliográficas

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRASHEV, R I. et al. Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger* 26. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 977-983, 2008.

ADAMS, T. H.; WIESER, J. K.; YU, J. H.; Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n.1, p. 35-54, 1998.

AHMED, F. E.; SETLOW R.B. Ultraviolet radiation-induced DNA damage and its photorepair in the skin of the platyfish *Xiphophorus*. **Cancer research,** v. 53, p. 2249-2255, 1993.

AL-RUBEAI, M. A.; EL-HASSI, M. F**.** Inactivation of wild type and mutant *Aspergillus nidulans* by far-UV, near-UV, visible and sun lights. **Environmental and Experimental Botany**, v. 26, p. 243-252, 1986.

ANDRIANOPOULUS, A.; TIMBERLAKE, W. E. The *Aspergillus nidulans abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. **Molecular Cell Biology**, v. 14, p. 2503–2515, 1994.

ARAMAYO, R. et al. *Asm-l*+a*, Neurospora crassa* Gene Related to Transcriptional Regulators of Fungal Development. **Genetics**, v. 144, p. 991-1003, 1996.

ARAMI, S.; HADA M.; TADA M. Reduction of ATPase activity accompanied by photodecomposition of ergosterol by near-UV irradiation in plasma membranes prepared from *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 143, p. 2465-2471, 1997.

BARTLEY, G. E. et al. Carotenoid desaturases from *Rhodobacter capsulatus* and *Neurospora crassa* are structurally and functionally conserved and contain domains homologous to flavoproteindisulfite oxidoreductases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, N. 26, p. 16020-16024, 1990.

BENDER, K. et al. UV-induced signal transduction. **Journal of Photochemistry and Photobiology Biology,** v. 37, n. 1-2, p. 1-17, 1997.

BENNETT, J. W. *Aspergillus*: a primer for the novice. **Medical Mycology**, v. 47, n. 1, p. S5-S12, 2009.

BERNARD, M.; LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. **Medical Mycology**, v. 39, n. 1, p. 9-17, 2001.

BERROCAL-TITO, G. M. et al. Characterization of blue-light and developmental regulation of the photolyase gene *phr1* in *Trichoderma harzianum*. **Photochemistry and Photobiolology**, v. 71, n. 5, p. 662-668, 2000.

BHANOORI, M.; VENKATESWERLU, G. The alkaline single cell gel electrophoresis: a new test for assessing DNA single strand breaks in *Neurospora crassa*. **Mutation Research**, v. 405, n. 1, p. 29-34, 1998.

BHARTI, A. K.; KHURANA, J. P. Mutants of *Arabidopsis* as tools to understand the regulation of phenylpropanoid pathway and UVB protection mechanisms. **Photochemistry and Photobiolology**, v. 65, n. 5, p. 765-776, 1997.

BIDOCHKA, M. J. et al. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? **Applied and Environmental Microbiology,** v. 67, n. 3, p. 1335-1342, 2001.

BING – RONG, Z. et al. Protective effect of the Baicalin against DNA damage induced by ultraviolet B irradiation to mouse epidermis. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 24, p. 175-182, 2008.

BIRRELL, G. M. et al. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to DNA-damaging agents does not identify the genes that protect against these agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v. 99, p. 8778-8783, 2002.

BIRRELL, G. W. et al. Genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes affecting UV radiation sensitivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v. 98, p. 12608-12613, 2001.

BRAGA, G. U. L. et al.Oxygen consumption by *Metarhizium anisopliae* during germination and growth on different carbon sources. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 74, p. 112-119, 1999.

BRAGA, G. U. L. et al. Effects of UVB irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. **Photochemistry and Photobiolology,** v. 73, p. 140-146, 2001a.

BRAGA, G. U. L. et al. Effects of UVB on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v. 105, p. 874-882, 2001b.

BRAGA, G. U. L. et al. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiolology,** v. 74, p. 734-739, 2001c.

BRAGA, G. U.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W.; Variability in response to UVB among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. **Journal of Invertebrate Pathology,** v. 78, p. 98-108, 2001d.

BRAGA G. U. L. et al. Damage and recovery from UVB exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. **Mycologia**. v. 94, p. 912-920, 2002.

BRAGA, G. U. L. et al. Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiolology,** v. 82, p. 418- 422, 2006.

BREAKSPEAR A.; MOMANY M. *Aspergillus nidulans* conidiation genes *dewA*, *fluG*, and *stuA* are differentially regulated in early vegetative growth. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 9, p. 1697–1700, 2007.

_____ **.** The first fifty microarray studies in filamentous fungi. **Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 7-15, 2007.

BRENDEL, M.; HENRIQUES, A. P. The *pso* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism. **Mutation Research**, v. 489, p.79-96, 2001.

CADET, J.; SAGE, E.; DOUKI, T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. **Mutation Research**, v.551, p. 3-17, 2005.

CALDWELL, M. M. et al. Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems*.* **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 46, p. 40-52, 1998.

CALDWELL, M. M.; FLINT, S. D. Uses of biological spectral weighting functions and the need of scaling for the ozone reduction problem. **Plant Ecology**, v. 128, p. 66-76, 1997.

CHAN, C. Y.; SCHIESTL R. H. *Rad1*, *rad10 and rad52* Mutations Reduce the Increase of Microhomology Length during Radiation-Induced Microhomology-Mediated Illegitimate Recombination in *Saccharomyces cerevisiae.* **Radiation Research**, v.172, n. 2, p. 141-151, 2009.

CHEADLE, C. et al. Application of z-score transformation to Affymetrix data. **Applied Bioinformatics,** v. 2, p.209-17, 2003.

CHELICO, L. et al. Nucleotide excision repair and photoreactivation in the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*, *B. nivea*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces farinosus*, and *Verticillium lecanii*. **Journal Applied Microbiology**, v. 100, p. 964-972, 2006.

CHELICO, L. et al. Quantification of ultraviolet-C irradiation induced cyclobutane pyrimidine dimers and their removal in *Beauveria bassiana* conidiospore DNA. **Mycologia**, v. 97, n. 3, p.621-627, 2005.

CHELICO, L.; KHACHATOURIANS, G. G. Isolation and characterization of nucleotide excision repair deficient mutants of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 93-100, 2008.

CLINGEN, P. H. et al. Correlation of UVC and UVB cytotoxicity with the induction of specific photoproducts in T-lynphocytes and fibroblasts from normal human donors. **Photochemistry and Photobiology,** v. 61, p. 163-170, 1995.

CORNISH, E. J. et al. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase - independent resistance to *Aspergillus fumigatus* in alveolar macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 180, p. 6854-6867, 2008.

CRENSHAW D. G. et al. The mitotic peptidyl-prolyl isomerase, Pin1, interacts with Cdc25 and Plx1. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 5, p.1315–1327, 1998.

D'ENFERT, C. et al. Attenuated virulence of uridine-uracil auxotrophs of Aspergillus fumigatus. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 10, p. 4401-4405, 1996.

DERISI, J. et al. Genome *microarray* analysis of transcriptional activation in multidrug resistance yeast mutants. **FEBS Letters**, v. 470, p.156-160, 2000.

DO, J. H.; YAMAGUCHI, R.; MIYANO, S. Exploring temporal transcription regulation structure of *Aspergillus fumigatus* in heat shock by state space model. **BIO MED CENTRAL Genomics,** v. 10, n. 306, p. 1471-2164, 2009.

DONNELLY, E.; BARNETT, Y. A.; MC CULLOUGH, W. Quantification of DNA damage and repair in amino acid auxotrophs and UV – sentitive mutants of *Aspergillus nidulans* using an ELISA. **FEBS Letters**, v. 377, p. 118 – 122, 1995.

DOUKI, T.; LAPORTE, G.; CADET, J. Inter – strand photoproducts are produced in high yield within A – DNA exposed to UVC radiation. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n.12, p. 3144-3142, 2003.

DUTTON, J. R. et al. StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans.* **The EMBO Journal**, v.16, n. 18, p. 5710–5721, 1997.

EISEN, M. B. et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América,** v. 95, p. 14863-14868, 1998.

EKER, A. P. M.; YAJIMA, H.; YASUI, A. DNA photolyase from the fungus *Neurospora crassa*. Purification, characterization and comparison with other photolyases. **Photochemistry and Photobiology**, v. 60, p.125-133, 1994.

ELLEDGE, S. J. Cell cycle checkpoints: Preventing na identity crisis. **Science,** v. 204, p. 1664-1672, 1996.

ENGELBERG D. et al. The UV response involving the Ras signaling pathway and AP-1 transciption factors is conserved between yeast and mammals. **Cell,** v. 77, p. 381-390, 1994.

FARGUES J. et al. Inactivation of conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by near-ultraviolet (UVB and UVA) and visible radiation. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 69, p. 70-78, 1997.

FARGUES J. et al. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. **Mycopathologia**, v. 135, p. 171-181, 1996.

FEDOROVA, N. D. et al. Using aCGH to study intraspecific genetic variability in two pathogenic molds, *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. **Medical Mycology**, v. 47, n. 1, p. S34-S41, 2009.

FERREIRA, M.E. et al. Transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to voriconazole. **Current Genetetics,** v. 50, n.1, p. 32-44, 2006.

FLIPPHI, M. et al. Fucional analysis of *alcS*, a gene of the alc cluster in *Aspergillus nidulans*. **Fugal Genetics and Biology**, v. 43, p. 247-260, 2006.

FOOTE, C. S. Definition of type I and type II photosensitised oxidations. **Photochemestry and Photobiology**, v. 54, p. 54-70, 1991.

FREDERICK, J. E.; ALBERTS A. D. The natural UV-A radiation environment. In: Urbach F ed. **Biological response to ultraviolet A radiation**. Overland Park, KA: Valdenmar Publishing Company, p. 7-18, 1991.

FREIMOSER, F. M.; HU, G.; ST LEGER, R. J. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. **Microbiology**, v. 151, n. 2, p. 361-71, 2005.

FRIEDBERG, E. C. et al. DNA repair and Mutagenesis. **Overland Park, KA: Valdenmar Publishing Company**, p. 423, 1995.

GALAGAN, J. E. et al. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. **Nature**, v. 438, n. 7071, p.1105-1115, 2005.

GARDNER, W. A.; SUTTON, R. M.; NOBLET, R. Persistence of *Beauveria bassiana*, *Nomuraea rileyi*, and *Nosema necatrix* on soybean foliage. **Environmental Entomology**, v. 6, p. 616-618, 1977.

GARFINKEL, D. J.; BAILIS, A. M. Nucleotide excision repair, genome stability, and human disease:new insight from model systems. **Journal Biomedicine Biotechnology,** v. 2, p. 55-60, 2002.

GASCH, A. P. The genomics of yeast response to environmental stress and starvation. **Functional & Integrative Genomics**, v. 2, p. 181-192, 2002.

GATES, F.T.; LINN, S. Endonuclease V *Escherichia coli*. **The Journal Biological Chemistry**, v.252-5, p.1647-1653, 1977.

GEIS, P. A.,; SZANISZLO, P. J. Carotenoid pigments of the dematiaceous *fungus Wangiella dermatitidis*. **Mycologia**, v. 76, p. 268-273, 1984.

GERHARDT, K. E. et al. Tryptophan photolysis leads to a UVB-induced 66 KDa photoproduct of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) *in vitro* and *in vivo*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 70, p. 49-56, 1999.

GOLDMAN, G. H.; KAFER, E. *Aspergillus nidulans* as a model system to characterize the DNA damage response in eukariotes. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, p. 428-442, 2004.

GOLDMAN, G. H.; MCGUIRE, S. L.; HARRIS, S. D. The DNA damage response in filamentous fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 35, p. 183-195, 2002.

GRIFFITHS, H. R. et al. Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences,** v. 35, p. 189-237, 1998.

GUNASEKERA, T.S. et al. Responses of phylloplane yeasts to UVB (290-320 nm) radiation: interespecific differences in sensitivity. **Mycological Research,** v. 101, p. 779-785, 1997.

HELLINGWERF, K.J. et al. Photobiology of microorganisms: how photosensors catch photon to initialise signalling. **Molecular Microbiology**, v. 21, p. 683-693, 1996.

HIDEMA, J. et al. Ultraviolet B sensitive rice cultivar deficient in cyclobutyl pyrimidine dimer repair. **Plant Physiology,** v. 113, p. 39-44, 1997.

HIDEMA, J. et al. UV Radiation-Sensitive Norin 1 rice contains defective cyclobutane pyrimidine dimer photolyase. **The Plant Cell**, v. 12, p. 1569-1578, 2000.

HOEIJMAKERS, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, p.366-374, 2001.

HOLLÓSY, F. Effects of untraviolet radiation on plant cells. **Micron**, v. 33, p. 179-197, 2002.

IGNOFFO, C. M.; GARCIA C**.** Influence of conidial color on inactivation of several entomogenous fungi (hyphomycetes) by simulated sunlight. **Environmental Entomology**, v. 21, p. 913-917, 1992.

IIDA, Y.; OHARA, T.; TSUGE, T. Identification of genes up-regulates during conidiation of *Fusarium oxysporum* through expressed sequence tag analysis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 43, p. 179-189, 2006.

JOUX, F. et al. Marine bacterial isolates display diverse responses to UVB radiation. **Applied and Enviromental Microbiology**. v. 65, n. 9, p. 3820-3827, 1999.

KAWAMURA, C. et al. Targeted discuption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and uv tolerance in the japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. **Molecular Plant- Microbe Interaction**, v. 12, p. 59-63, 1999.

KIRCHHOFF, V. W. J. H. et al. Evidence for an ozone hole perturbation at 30º south. **Atmospheric Environment**, v. 30, p. 1481-1488, 1996.

KNIEMEYER, O. et al. Optimisation of a 2-D gel electrophoresis protocol for the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Current Genetics**, v. 49, p. 178-189, 2006.

KOBAYASHI, E. et al. Quantitation and visualization of ultraviolet – induced DNA damage using specific antibodies: aplication to pigment cell biology (Review). **Pigment Cell Research,** v. 14, p. 94-102, 2001.

KUANG-YU, J.; CHEUNG, V. G. Transcriptional response of lymphoblastoid cells to ionizing radiation. **Genome Research,** v. 13, p. 2092-2100, 2003.

KUSEWITT, D. F. et al. Altered UV resistance and UV mutational spectrum in repair-proficient murine fibroblasts expressing endonuclease V. **Mutation Research**, v. 407, p. 157-168, 1998.

LACAZ, C. A. et al. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAMARRE, C. et al. Transcriptomic analysis of the exit from dormancy of aspergillus fumigatus conidia. **Bio Med Central Genomics**, v. 9, n. 417, 2008.

LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 2, p. 310-350, 1999.

LATGÉ, J. P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. **Trends in Microbiology**, vol. 9, n .8, p. 382-389, 2001.

LENGELER, K. B.; KOTHE, E**.** Identification and characterization of *brt1*, a gene down-regulated during B-regulated development in *Schizophyllum commune*. **Current Genetics**, v. 35, p. 551–556, 1999.

LI, H. et al. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor is required in *Aspergillus fumigates* formorphogenesis and virulence. **Molecular Microbiology**, v. 64, p. 1014-1027, 2007.

LIMA – BESSA, K. M. et al. CPDs and 6-4 PPs play different roles in UV- induced cell death in normal and NER – deficient human cells. **DNA Repair**. v. 7, p. 303- 312, 2008.

LINDEN, H. et al. Seeing the light: news in *Neurospora* blue light signal transduction. **Advances in Genetics**. v. 41, p. 35-54, 1999.

LOEFFLER, J. et al. Interaction analyses of human monocytes co-cultured with different forms of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 49-58, 2009.

LONGHESE, M. P. et al. DNA damage checkpoint in budding yeast. **EMBO Journal,** v. 19, p. 5525-5528, 1998.

MALAVAZI, I. **Caracterização funcional de diferentes componentes das vias metabólicas de resposta ao dano ao DNA no fungo filamentoso *Aspergillus nidulans***. 2007. 379 f. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2007.

MALDRONICH, S. et al. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 46, p. 5-9, 1998.

McKENZIE, R. et al. Increased summertime UV radiation in New Zealand in response to ozone loss. **Science**, v. 285, p. 1709-1711, 1999.

MILLER, C. D. et al. Enzyme activities associated with oxidative stress in *Metarhizium anisopliae* during germination, mycelial growth, and conidiation and in response to near-UV irradiation. **Canadian Journal Microbiology,** v. 50, n.1, p. 41-9, 2004.

MILLER, K. Y.; WU, J.; MILLER, B. L. *StuA* is required for cell pattern formation in *Aspergillus.* **Genes Development***,* V. 6, P. 1770-1782, 1992.

MOELLER, R. et al. DNA bipyrimidine photoproduct repair and transcriptional response of UV-C irradiated *Bacillus subtillis*. **Archives of Microbiology**, v.188, p. 421-431, 2007.

MOMANY, M. Polarity in filamentosus fungi: establishment, maintenance and new axes. **Current Opinion in Microbiology,** v. 5, p. 580-585, 2002.

MOODY, S. A. et al. Variation in the responses of litter and phyllophane fungi to UVB radiation (290-315 nm). **Mycology Research**, v. 103, p. 1469-1477, 1999.

MOORE, D. et al. Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. **Annals of Applied Biology**, v. 122, p. 605-616, 1993.

MORISHITA, R. et al. Ribonuclease Activity of Rat Liver Perchloric Acid-soluble Protein a Potent Inhibitor of Protein Synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 29, p. 20688–20692, 1999.

MORLEY-DAVIS, J. et al. Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. **Mycology Research,** v. 100, p. 31-38, 1995.

MOWAT, E. et al. The characteristics of Aspergillus fumigatus mycetoma development: is this a biofilm? **Medical Mycology**, v. 47, n. 1, p. S120-S126, 2009.

MUELA, A. et al. Humic Materials Offer Photoprotective Effect to *Escherichia coli* Exposed to Damaging Luminous Radiation. **Microbial Ecology,** v. 40, n. 4, p. 336-344, 2000.

MUNAKATA, N. et al. Experimental correspondense between spore dosimetry and spectral photometry of solar ultraviolet radiation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 63, p. 74-78, 1996.

NICHOLSON, W. L. et al. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology Molecular Biology Review,** v. 64, p. 548-572, 2000.

NIERMAN, W. C. et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**. v. 438, n. 7071, p. 1151- 1156, 2005.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cellular Microbiology**. v. 5, p. 203-223, 2003.

NOVENTA-JORDÃO, M. A. et al. Catalase activity is necessary for heat-shock recovery in *Aspergillus nidulans* germlings. **Microbiology**, v.145, p. 3229–3234, 1999.

OGUMA, K. et al. Determination of pyrimidine dimers in *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* during UV light inativation, photoreactivation, and dark repair. **Applied and environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4630-4637, 2001.

PAN, X.; HEITMAN, J. Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Cell Biolology**, v. 19, p. 4874–4887, 1999.

PARIS, S. et al. Catalases of *Aspergillus fumigatus*. **Infection and immunity**, v.71, n. 6, p. 3551-3562, 2003.

PARNELL, M. et al. The influence of exposure to ultraviolet radiation in simulated sunlight on ascospores causing Black Sigatoga disease of banana and plantain. **International Journal of Biometeorology,** v. 42. p. 22-27, 1998.

PAUL, N. D. et al. The use of wavelength-selective plastic cladding materials in horticulture: understanding of crop and fungal responses through the assessment of biological spectral weighting functions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, p. 1052-1060, 2005.

PAUL, N. D. Stratospheric ozone depletion, UVB radiation and crop disease. Environmental Pollution, v. 108, p. 343-355, 2000.

PAUL, N.D. et al. The role of interactions between trophic levels in determining the effects of UVB on terrestrial ecosystems. **Plant Ecology**, v. 128, p. 296-308, 1997.

PAULOVICH, A. G. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* RAD9, RAD17, RAD24, and MEC3 genes are required for tolerating irreparable, ultraviolet-induced damage. **Genetics**, v. 150, p. 75-93, 1998.

PEAK, M. J. et al. **Cellular and molecular effects of UV-A radiation**. In: Urbach F. ed. Biological response to ultraviolet A radiation. Overland Park, KA: Valdenmar Publishing Company, p. 39-46, 1991.

PEAK, M. J.; PEAK, J. G. Use of action spectra for identifying molecular targets and mechanisms of action of solar ultraviolet light. **Physiology Plant,** v. 58, p. 367-372, 1983.

PECCIA, J.; HERNANDEZ, M. Rapid Immunoassays for detection of UV – induced cyclobutane pyrimidine dimers in whole bacterial cells. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2542-2549, 2002.

PERAZA, L. HANSBERG, W. *Neurospora crassa* catalases, singlet oxygen and cell differentiation. **Biologycal Chemistry**, v. 383, p. 569-575, 2002.

PETIN, V. G. et al. Fluence rate as a determinant of synergistic interaction under simultaneous action of UV light and mild heat in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 38, p. 123-128, 1997.

PETIT-FRÈRE, C. et al. Inhibition of RNA and DNA synthesis in UV-irradiated normal human fibroblasts is correlated with pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct formation. **Mutation Research**, v. 354, p. 87-94, 1996.

PFEIFER, G. P. et al. Mutations induced by ultraviolet light (Review). **Mutation Research**, v. 571, p. 19-31, 2005.

PFEIFER, G. P. Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. **Photochemistry and Photobiolog,** v. 65, p. 270-283, 1997.

PIVA, T.J. et al. Effect of UV radiation on cell surface protease activity and amino acid uptake. **Mutation Research**, v. 422, p. 55-67, 1998.

PONGPOM, P.; COOPER JR, C. R.; VANITTANAKOM, N. Isolation and characterization of a catalase-peroxidase gene from the pathogenic fungus, *Penicillium marneffei*. **Medical Mycology**, v. 43, p. 403-411, 2005.

QUAITE, F. E. et al. Action spectrum for DNA damage in alfalfa lowers predicted impact of ozone depletion. **Nature,** v. 358, p. 576-578, 1992.

RANGEL, D. E. et al. Influence of growth environment on tolerance to UVB radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae var. acridum* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 90, n. 1, p. 55-8, 2005.

RANGEL, D. E. et al. Variations in UVB tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 87, p. 77-83, 2004.

RASANAYAGAM, MS. et al. Variation in responses of spores of *Septoria tritici* and *S. nodorum* to UVB irradiation *in vitro*. **Mycology Research,** v. 99, p. 1371-1377, 1995.

REMENTERIA, A. et al. Genes and molecules involved in Aspergillus fumigatus virulence. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 22, p. 1-23, 2005.

RENSING, L. et al. Differential stress gene expression during the development of *Neurospora crassa* and other fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 168, p. 159-166, 1998.

REYNOLDS, R. J.; FRIEDBERG, E. G. Molecular mechanisms of pyrimidine dimer excision in *Saccharomyces cerevisiae*: Incision of ultraviolet-irradiated deoxyribonucleic acid in vivo. **Journal of Bacteriology**, v. 146-142, p. 692-704, 1981.

RICH, T. et al. Defying death after DNA damage. **Nature**, v. 407, p. 777-78, 2000.

ROBERTS, D. W.; ST LEGER, R. J. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. **Advances Applied Microbiology**, v. 44, p.1-70, 2004.

ROBERTSON, L. S.; FINK, G. R. The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 13783–13787, 1998.

RONNING, C. M. et al. Genomics of *Aspegillus fumigatus*. **Revista Iberoamericana de Micologia,** v. 22, p. 223-228, 2005.

ROTEM, J. et al. The role of solar radiation, especially ultraviolet, in the mortality of fungal spores. **Phytopathology**, v. 75, p. 510-514, 1985.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 3rd. ed., vol 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, 2001.

SAMETZ-BARON, L. et al. Photoreactivation of UV-inactivated spore of *Trichoderma harzianum*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 65, p. 849-854, 1997.

SANCAR, A. Structure and function of DNA photolyase. **Biochemistry**, v. 33, p. 2-9, 1994.

SCHUMMER, M. et al. Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. **Gene,** v. 238, p. 375-85, 1999.

SEMIGHINI, C. P. et al. Quantitative analysis of the relative transcript levels of ABC transporter Atr genes in *Aspergillus nidulans* by Real-Time Reverse Transcription-PCR assay. **Applied Enviromental Microbiology**, v. 68, p. 1351–1357, 2002.

SESTO, A. et al. Analysis of the ultraviolet B response in primary human keratinocytes using oligonucleotide *microarray*s. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v. 99, p. 2965-2970, 2002.

SETLOW, P. Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus* species. **Annual Review Microbiology**, v. 49, p. 29-54, 1995.

SHEPPARD, D. C. et al. The *Aspergillus fumigatus* StuA Protein Governs the Up-Regulation of a Discrete Transcriptional Program during the Acquisition of Developmental Competence. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, p. 5866–5879, 2005.

SHIBUYA, K. et al. Catalases of *Aspergillus fumigatus* and inflammation in aspergillosis**. Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 47, n. 4, p. 249-55, 2006.

SLIEMAN, T. A.; NICHOLSON, W. L. Artificial and solar UV radiation induces strand breaks and cyclobutane pyrimidine dimers in *Bacillus subtilis* spore DNA. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 66, n. 1, p. 199-205, 2000.

SPIVAK, G. et al. Ultraviolet-sensitive syndrome cells are defective in transcription-couple repair of cyclobutane pyrimidine dimers. **DNA repair,** v. 1, p. 629-643, 2002.

STRINGER, M. A. et al. Rodletless a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. **Genes & Development**, v. 5, p. 1161-1171, 2008.

SUGUI, J. A. et al. Genes differentially expressed in conidia and Hyphae of *Aspergillus fumigatus* upon Exposure to Human Neutrophils. **Plos one,** v. 3, n. 7, p. e2655, 2008.

SUTHERLAND, B. M, et al. Quantifying DNA damage by gel eletroctrophoresis, eletronic imaging and number-average length analysis. **Electrophoresis**, v. 22, p. 843-854, 2001.

SUTHERLAND, B. M. et al. DNA damage quantification by alkaline gel electrophoresis. **Methods in molecular biology: DNA repair Protocols: Mammalian Systems**. Totowa, NY. Second Edition, p. 251-273, 2006.

SUTHERLAND, B. M. et al. Pyrimidine dimer formation and repair in human skin. **Cancer Research**, v. 40, p. 3181-3185, 1980.

TEINBACH, W. J. et al. Advances against aspergillosis. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious**, v. 27, n. 3, p. S155-156, 2003.

TRAUTINGER, F. et al. Stress proteins in the cellular response to ultraviolet radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 35, p. 141-148, 1996.

TSAI, H. F. et al. *Aspergillus fumigatus arp1* modulates conidial pigmentation and complement deposition. **Molecular Microbiology,** v. 26, n. 1, p. 175-183, 1997.

TSAI, H. F. et al. A Developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Bacteriology**, v. 181-120, p. 6469-6477, 1999.

TYRRELL, R. M. Biological dosimetry and action spectra. **Journal Photochemistry and Photobiology**, v. 31, p. 35-41, 1995.

VAN PRAAG, M. C. G. et al. Determination of the photoprotective efficacy of a topical sunscreen against UVB - induced DNA damage in human epidermis. **Journal of photochemistry and photobiology**, v. 19, p. 129-134, 1993.

VANITTANAKOM, N, et al. Isolation and expression of *heat shock* protein 30 gene from *Penicillium marneffei*. **Medical Mycology**, v. 47, p. 521-526, 2009.

VANITTANAKOM, N. et al. *Penicillium marneffei* infection and recent advances in the epidemiology and molecular biology aspects. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 95-110, 2006.

VEATCH, W.; OKADA, S. Radiation-induced breaks of DNA in cultured mammalian cells. **Biophys Journal**, v. 9, p. 330-46, 1969.

WANG, Y. et al. Gene profiling in murine corneas challenged with *Aspergillus fumigatus*. **Molecular Vision**, v. 13, p. 1226-33, 2007.

WARD, M. *Aspergillus nidulans* and other filamentous fungi as genetic systems In: STREIPS, U. N.; YASBIN, R. E. (Ed.) **Modern Microbial Genetics**, New York: Wiley-Liss Inc, p. 355-496, 1991.

WILLOCQUET, L. et al. Effects of radiation, especially ultraviolet B, on conidial germination and mycelial growth of grape powdery mildew. **European Journal of Plant Pathology,** v. 102, p. 441-449, 1996.

YASUDA, S.; SEKIGUCHI, M. T4 endonuclease V involved in repair of DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 67, p. 1839-1845, 1970.

YOU, Y. H. et al. Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells. **The journal biological chemistry**, v. 276, p. 44688-44694, 2001.

YU, J. H.; KELLER, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. **Annual Review Phytopathology**, v. 43, p. 437-458, 2005.

ZHOU, B. B. S.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature**, v. 408, p.433-439, 2000.

ZIMMERMANN G. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 40, p. 36-40, 1982.

Apêndices

APÊNDICES

APÊNDICE A. Genes mais expressos no micélio de *Aspergillus fumigatus*, com 20 h de desenvolvimento (início da conidiogênese), em relação ao micélio jovem, com 16 h de desenvolvimento.

Locus	Gene N	Log_2(Cy5/Cy3)
Afu1g04620	alcohol dehydrogenase, zinc-containing, putative	2,124993
Afu3g07890	endo alpha-1,4 polygalactosaminidase, putative	1,7573773
Afu5g03780	L-PSP endoribonuclease family protein (Brt1), putative	1,7189598
Afu8g04120	carboxypeptidase S1, putative	1,4245027
Afu5g04270	AMP-binding protein	1,3371499
Afu2g07900	APSES transcription factor (StuA), putative	1,1573
Afu1g02890	dUTPase	1,0027373

APÊNDICE B. Genes mais reprimidos no micélio de *Aspergillus fumigatus* com 20 h de desenvolvimento (início da conidiogênese) em relação ao micélio jovem com 16 h de desenvolvimento.

Locus	Gene N	Log_2(Cy5/Cy3)
Afu5g13390	conserved hypothetical protein	-4,719439
Afu5g08090	pyridoxine biosynthesis protein	-4,5096407
Afu8g04610	DnaJ domain protein	-4,467996
Afu5g03020	60s ribosomal protein l2	-4,445576
Afu3g09960	aureobasidin resistance protein Aur1	-4,3750887
Afu4g04520	succinyl-CoA synthetase beta subunit, putative	-4,3630967
Afu2g09490	eukaryotic initiation factor 4F subunit (eIF4F p130), putative	-4,286846
Afu1g04540	NADH-cytochrome b5 reductase precursor	-4,1608186
Afu3g10920	ribosome associated protein (Stm1), putative	-4,1542697
Afu6g13330	conserved hypothetical protein	-4,0776486
Afu6g14060	hypothetical protein	-4,004353
Afu1g02070	cytochrome c1, heme protein precursor	-3,990531
Afu4g14380	conserved hypothetical protein	-3,9665945
Afu5g01450	NADH-dependent flavin oxidoreductase, putative	-3,9255314
Afu3g06460	conserved hypothetical protein	-3,8988757
Afu2g03010	cytochrome c subunit Vb, putative	-3,8844476
Afu2g06150	disulfide isomerase, putative	-3,8728118
Afu4g11650	2-oxoglutarate dehydrogenase complex alpha subunit, putative	-3,867914
Afu5g02470	thiamine biosynthesis protein (Nmt1), putative	-3,7875912
Afu4g13120	glutamine synthetase	-3,7629137
Afu2g05500	NADH-ubiquinone oxidoreductase 21 kDa subunit, putative	-3,7526555
Afu2g15590	sulfite reductase [NADPH], putative	-3,6612573
Afu3g12690	conserved hypothetical protein	-3,6526468
Afu1g11960	alternative NADH-dehydrogenase	-3,6206772
Afu5g07710	nuclear migration protein (ApsA), putative	-3,6016576
Afu1g14300	Fasciclin domain family	-3,2377245
Afu4g03360	GPI anchored protein, putative	-1,1832371

APÊNDICE C. Genes mais expressos no micélio de *Aspergillus fumigatus*, com 24 h de desenvolvimento (fase intermediária da conidiogênese), em relação ao micélio jovem, com 16 h de desenvolvimento.

Locus	Gene N	Log_2(Cy5/Cy3)
Afu7g00790	hypothetical protein	1,5248893
Afu1g11670	small nuclear ribonucleoprotein (LSM8), putative	1,3472321
Afu2g16550	conserved hypothetical protein	1,2594051
Afu3g13080	hypothetical protein	1,2070249
Afu3g00730	conserved hypothetical protein	1,1514648
Afu3g03470	hypothetical protein	1,1396383
Afu3g13130	HHE domain protein	1,1282908
Afu8g05040	dihydrodipicolinate synthetase family protein	1,0922061
Afu3g09830	conserved hypothetical protein	1,0497574
Afu4g03870	ELL complex EAP30 subunit	1,0432262
Afu6g14460	2-haloalkanoic acid dehalogenase	1,039095
Afu1g00100	monocarboxylate transporter (MCT), putative	1,0177891

APÊNDICE D. Genes mais reprimidos no micélio de *Aspergillus fumigatus*, com 24 h de desenvolvimento (fase intermediária da conidiogênese), em relação ao micélio jovem, com 16 h de desenvolvimento.

Locus	Gene N	Log_2(Cy5/Cy3)
Afu6g00620	GPI anchored hypothetical protein	-6,1363425
Afu1g06960	pyruvate dehydrogenase complex alpha subunit, putative	-5,7211094
Afu2g04080	GPR/FUN34 family protein	-5,6700015
Afu5g01620	conserved hypothetical protein	-5,6047373
Afu5g04210	ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein 2, putative	-5,565343
Afu1g14200	mitochondrial processing peptidase beta subunit, putative	-5,553059
Afu1g03610	hypothetical protein	-5,521269
Afu2g09960	mitochondrial Hsp70 chaperone (Ssc70), putative	-5,494029
Afu1g10630	S-adenosylmethionine synthetase	-5,4595294
Afu6g10660	ATP-citrat-lyase	-5,4037814
Afu2g12400	ATP synthase oligomycin sensitivity conferral protein, putative	-5,3793178
Afu6g06370	NAD( )-isocitrate dehydrogenase subunit I	-5,365434
Afu5g04370	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 Kd subunit, putative	-5,270639
Afu6g02470	fumarate hydratase, putative	-5,267997
Afu2g02100	dihydrolipoamide dehydrogenase	-5,164093
Afu2g08570	small subunit of nuclear cap-binding protein complex	-5,121294
Afu1g12800	isocitrate dehydrogenase, NAD-dependent	-5,1056848
Afu3g10310	acetolactate synthase, large subunit, putative	-5,0939884
Afu4g14380	conserved hypothetical protein	-5,093544
Afu6g08050	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	-5,0831513
Afu5g10370	succinate dehydrogenase iron-sulphur protein	-5,0468154
Afu2g10770	C2H2 transcription factor (Con7), putative	-5,0133367
Afu4g08030	conserved hypothetical protein	-4,994269
Afu1g13500	transketolase TktA	-4,9934664
Afu8g04610	DnaJ domain protein	-4,9916644
Afu1g04190	polyadenylate-binding protein	-4,9867296
Afu1g06900	C2H2 transcription factor (Crz1), putative	-4,9757504
Afu6g08310	proteasome component Pre2, putative	-4,9607954
Afu4g04070	conserved hypothetical protein	-4,958713
Afu1g12530	oleate delta-12 desaturase	-4,952612
Afu1g11940	mitochondrial large ribosomal subunit protein L15, putative	-4,9489946
Afu1g09470	aminotransferase, class V, putative	-4,9403324
Afu6g13070	UDP-galactose transporter, putative	-4,938386
Afu1g04720	C-8 sterol isomerase (Erg-1), putative	-4,917553
Afu4g13720	MAP kinase (MpkA), putative	-4,9093103
Afu7g05720	pyruvate dehydrogenase complex, dihydrolipoamide acetyltransferase component, putative	-4,8944435
Afu3g13030	t-complex protein 1, gamma subunit, putative	-4,8864894
Afu4g09080	C2H2 transcription factor (Seb1), putative, putative	-4,8838964

Continua

Continuação

Afu1g07690	protein O-mannosyl transferase	-4,8668365
Afu3g07810	succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit	-4,8549285
Afu3g00900	alpha-amylase AmyA	-4,849498
Afu1g13940	SUN domain protein (Adg3), putative	-4,805857
Afu3g10800	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit CLU1/TIF31, putative	-4,802624
Afu7g06060	siderochrome-iron transporter (Sit1), putative	-4,788758
Afu5g10560	cytochrome c oxidase subunit V	-4,7746744
Afu5g04230	citrate synthase, eukaryotic	-4,768501
Afu7g01510	SNARE domain protein	-4,7251797
Afu1g12170	translation elongation factor EF-Tu, putative	-4,676639
Afu5g12550	N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol deacetylase, putative	-4,6556387
Afu5g02470	thiamine biosynthesis protein (Nmt1), putative	-4,6548357
Afu6g13380	hypothetical protein	-4,6516485
Afu3g12690	conserved hypothetical protein	-4,593778
Afu3g11710	saccharopine dehydrogenase, putative	-4,5937047
Afu4g08660	oligosaccharyltransferase subunit ribophorin II, putative	-4,582951
Afu5g03560	glutamyl-tRNA synthetase	-4,5632224
Afu1g14220	fibrillarin	-4,5504866
Afu3g14490	Ketol-acid reductoisomerase	-4,535201
Afu4g09960	conserved hypothetical protein	-4,523306
Afu5g06190	STE and C2H2 transcription factor (SteA), putative	-4,522558
Afu1g16280	mitochondrial F1F0-ATP synthase g subunit, putative	-4,520923
Afu2g11120	hypothetical protein	-4,495343
Afu5g13540	vacuolar armadillo repeat protein Vac8, putative	-4,4384165
Afu2g16400	translation initiation factor 4B	-4,4229245
Afu1g13450	vegetative cell wall protein gp1	-4,3848076
Afu2g14670	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit EifCd, putative	-4,374936
Afu5g10610	ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit precursor	-4,345562
Afu4g03630	sterol 24-c-methyltransferase, putative	-4,339358
Afu4g06040	hypothetical protein	-4,289918
Afu2g11940	adenylosuccinate lyase (Ade13), putative	-4,2286124
Afu3g11430	arginase	-4,227296
Afu3g09990	hypothetical protein	-4,22515
Afu2g16500	conserved hypothetical protein	-4,1849055
Afu4g13700	threonyl-tRNA synthetase, putative	-4,129541
Afu2g03610	IMP dehydrogenase, putative	-4,0802445
Afu5g12750	hypothetical protein	-4,0752764
Afu6g12770	proteasome regulatory particle subunit (RpnI), putative	-4,073842
Afu5g05920	glycyl-tRNA synthetase	-4,071717
Afu2g01830	hypothetical protein	-4,0106773
Afu4g13670	WSC domain protein, putative	-3,988687
Afu6g06450	proteasome component Pre4, putative	-3,6851635
Afu1g07740	LEM3/CDC50 family protein	-1,5080911

Continua

Conclusão		
Afu3g12840	Signal peptidase I	-1,4360324
Afu8g01670	bifunctional catalase-peroxidase Cat2	-1,3812374
Afu1g06210	N-acetylglucosamine-phosphate mutase	-1,3530395
Obsolete	Obsolete	-1,1354584
Afu2g16340	hypothetical protein	-1,0495344
Afu2g08880	hypothetical protein	-1,0328338
Afu5g08290	aldo-keto reductase, putative	-1,0111575
Afu2g01990	Signal recognition particle 14kD protein domain containing protein	-1,0035592

APÊNDICE E. Genes mais expressos em micélio de *Aspergillus fumigatus*, com 25 h de desenvolvimento (final da conidiogênese), em relação ao micélio jovem, com 16 h de desenvolvimento.

Locus	**Gene N**	**Log_2(Cy5/Cy3)**
Afu2g13590	hypothetical protein	1,7567014
Afu5g00100	hypothetical protein	1,6391805
Afu2g01040	formaldehyde dehydrogenase	1,5382175
Afu1g04750	cyclin	1,4127584
Afu2g11790	conserved hypothetical protein	1,2857565
Afu5g06680	4-aminobutyrate aminotransferase	1,184831
Afu7g04640	conserved hypothetical protein	1,1097534
Afu5g05790	ubiquitin ligase subunit HrtA, putative	1,0608356

APÊNDICE F. Genes mais reprimidos em micélio de *Aspergillus fumigatus*, com 25 h de desenvolvimento (final da conidiogênese), em relação ao micélio jovem, com 16 h de desenvolvimento.

Locus	Gene N	Log_2(Cy5/Cy3)
Afu5g10660	pentatricopeptide repeat protein	-4,935384
Afu3g04210	fatty acid synthase alpha subunit, putative	-4,8944044
Afu1g03390	60S ribosomal protein L12, putative	-4,799473
Afu7g02460	hypothetical protein	-4,7625093
Afu7g04490	Ribosomal protein S28e	-4,746015
Afu5g03300	hypothetical protein	-4,728056
Afu6g06370	NAD( )-isocitrate dehydrogenase subunit I	-4,502251
Afu1g12800	isocitrate dehydrogenase, NAD-dependent	-4,476658
Obsolete	Obsolete	-4,4625874
Afu5g01450	NADH-dependent flavin oxidoreductase, putative	-4,433328
Afu4g10800	40S ribosomal protein S6	-4,4150705
Afu1g04190	polyadenylate-binding protein	-4,317381
Afu6g13380	hypothetical protein	-4,2682815
Afu6g03540	malate synthase A	-4,125523
Afu6g10260	aldehyde reductase (AKR1), putative	-4,119148
Afu1g05500	cytosolic small ribosomal subunit protein S12	-4,102561
Afu7g06060	siderochrome-iron transporter (Sit1), putative	-4,0867996
Afu6g00620	GPI anchored hypothetical protein	-4,071195
Afu1g10080	C2H2 transcription factor, putative	-4,0545874
Afu6g07900	carbon catabolite repression protein CreD, putative	-3,9896526
Afu5g07780	squalene monooxygenase Erg1	-3,9869964
Afu3g00900	alpha-amylase AmyA	-3,962201
Afu1g10030	hypothetical protein	-3,956843
Afu5g06240	alcohol dehydrogenase, putative	-3,94889
Afu5g03560	glutamyl-tRNA synthetase	-3,9423206
Afu1g02070	cytochrome c1, heme protein precursor	-3,920893
Afu1g15270	ATP-dependent Clp protease, putative	-3,9158204
Afu8g03930	Hsp70 chaperone (HscA), putative	-3,896074
Afu1g03610	hypothetical protein	-3,888907
Afu8g00960	cytochrome P450, putative	-3,8722806
Afu5g03020	60s ribosomal protein l2	-3,8687894
Afu4g09750	60S ribosomal protein L7/L12 precursor	-3,8610537
Afu2g08570	small subunit of nuclear cap-binding protein complex	-3,8457005
Afu5g04230	citrate synthase, eukaryotic	-3,8384676
Afu2g15590	sulfite reductase [NADPH], putative	-3,773626
Afu3g01340	DUF636 domain protein	-3,7542098
Afu6g02910	acetylglutamate kinase, putative	-3,7102227
Afu1g07630	zinc knuckle domain protein (Byr3), putative	-3,6984293
Afu3g08840	coatomer alpha subunit, putative	-3,5587676

Continua

Conclusão

Afu1g15280	polysaccharide deacetylase family protein	-3,524097
Afu4g11550	hypothetical protein	-3,4980052
Afu1g09810	PUA RNA binding domain protein, putative	-3,4744942
Afu1g07410	hypothetical protein	-3,4620023
Afu4g11240	alpha-aminoadipate reductase large subunit, putative	-3,4446545
Afu5g06130	succinyl-CoA synthetase alpha subunit, putative	-3,4436994
Afu4g11650	2-oxoglutarate dehydrogenase complex alpha subunit, putative	-3,376597
Afu2g12470	acetylornithine aminotransferase	-3,372258
Afu8g04800	valyl-tRNA synthetase	-3,3596957
Afu2g03610	IMP dehydrogenase, putative	-3,356965
Afu1g13450	vegetative cell wall protein gp1	-3,3481023
Afu2g02560	Coatomer subunit gamma, putative	-3,340544
Afu1g14810	serine/threonine protein kinase (Kin4), putative	-3,3347127
Afu7g03980	PCI domain protein	-3,318166
Afu8g04610	DnaJ domain protein	-3,2992764
Afu3g05760	C6 transcription factor (Fcr1), putative	-3,2919824
Afu2g10610	COPI vesicle coat beta' subunit, putative	-3,2764149
Afu2g10600	NADH-ubiquinone oxidoreductase 299 kDa subunit, putative	-3,256689
Afu6g05140	sterol delta 5,6-desaturase ERG3	-3,2384415
Afu6g05110	mitochondrial import receptor subunit (tom40), putative	-3,238219
Afu1g11960	alternative NADH-dehydrogenase	-3,2327673
Afu5g10920	DUF221 domain protein, putative	-3,178552
Afu1g14120	nuclear segregation protein (Bfr1), putative	-3,1576214
Afu4g04550	conserved hypothetical protein	-3,1203074
Afu7g05070	FAD dependent oxidoreductase, putative	-3,0372806
Afu1g06620	acyl carrier protein, putative	-2,9902487
Afu5g04030	mitochondrial ribosomal protein L2 precursor	-2,8794198
Afu2g00370	conserved hypothetical protein	-2,8538842
Afu4g06900	asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing) 2	-2,8006737

APÊNDICE G. Lista dos genes mais expressos no micélio jovem *Aspergillus fumigatus*, exposto à radiação UVB (1000 mW m^{-2}) por 30 min.

Locus	Gene N	Log_2(Cy5/Cy3)
Afu4g06970	RADC	3,9660223
Afu7g05080	C6 transcription factor, putative	3,9000983
Afu6g04490	camp independent regulatory protein	3,8712232
Afu1g03110	ribosomal protein L29/heparin/heparan sulfate interacting protein	3,8464594
Afu5g05630	hypothetical protein	2,9150112
Afu6g02750	nascent polypeptide-associated complex (NAC) subunit, putative	2,8357046
Afu6g09335	SRF-type transcription factor family protein	2,8034453
Afu2g08130	ribosomal protein L41	2,6678462
Afu2g05950	snRNP and snoRNP protein (Snu13), putative	2,658221
Afu8g06820	hypothetical protein	2,6071537
Afu1g05340	ribosomal protein S19	2,5990558
Afu3g08630	MBF1	2,5889733
Afu1g04040	ubiquitin (UbiA), putative	2,5729358
Afu1g15020	40S ribosomal protein S5	2,5654643
Afu6g11620	formyltetrahydrofolate deformylase	2,5383794
Afu4g09000	mitochondrial 60S ribosomal protein L25, putative	2,4314487
Afu3g10460	nuclear transport factor 2	2,42752
Afu2g06080	GTPase activating protein (Gyp1), putative	2,4265406
Afu5g12430	aminomethyltransferase, probable [imported], putative	2,4128644
Afu4g06990	Transmembrane amino acid transporter protein superfamily	2,3533578
Obsolete	Obsolete	2,2927454
Afu1g06810	aconitate hydratase, mitochondrial	2,2785006
Afu2g10750	RNA helicase (Dbp), putative	2,27235
Afu2g00600	conserved hypothetical protein	2,2587256
Afu2g07870	Patatin-like serine hydrolase, putative	2,2422366
Afu3g02840	isopropanol dehydrogenase, putative	2,2345262
Afu1g12890	60s ribosomal protein l1	2,2150505
Afu6g04660	histone H3 variant, putative	2,1952012
Afu5g13510	cell cycle control protein (Cwf8), putative	2,181971
Afu5g15000	arsenate reductase (ArsC), putative	2,1710768
Afu8g04320	NADH-ubiquinone oxidoreductase 178 kDa subunit, putative	2,1421783
Afu1g09360	DUF1242 domain protein, putative	2,14198
Afu6g05350	aspartic-type endopeptidase (OpsB), putative	2,0995238
Afu8g01670	bifunctional catalase-peroxidase Cat2	2,0823658
Afu2g05440	Hypothetical protein	2,0773513
Afu8g05210	conserved hypothetical protein	1,9943868
Afu2g07990	hypothetical protein	1,9671054
Afu7g04870	hypothetical protein	1,92914
Afu1g15450	adenylosuccinate synthetase	1,9238895
Afu1g00950	hypothetical protein	1,8982736
Afu5g10750	ribosomal protein S12	1,8387941
Afu1g09490	RNP domain protein	1,8244132
Afu2g15770	conserved hypothetical protein	1,8223939
Afu6g07270	fadD6	1,8156807
Afu2g01480	conserved hypothetical protein	1,8067088
Afu2g13860	histone H4	1,6704614

Continua

Conclusão

Afu4g07740	small nuclear ribonucleoprotein SmB, putative	1,6581527
Afu1g01230	beta-xylosidase	1,5099066
Afu1g02890	dUTPase	1,5050886
Afu6g03750	Amidophosphoribosyltransferase	1,4392598
Afu5g11930	small nuclear ribonucleoprotein	1,2279017

APÊNDICE H. Lista de genes mais reprimidos no micélio jovem de *Aspergillus fumigatus*, exposto à radiação UV por 30 min.

Locus	Gene N	Log_2(Cy5/Cy3)
Afu1g03610	hypothetical protein	-4,6792006
Afu4g03010	hypothetical protein	-4,620561
Afu2g09650	aspartate transaminase, putative	-4,465116
Afu2g05060	alternative oxidase	-4,433665
Afu8g04650	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	-4,4085927
Afu2g01010	myo-inositol-phosphate synthase, putative	-4,4065413
Afu2g14990	tubulin alpha-2 subunit	-4,379432
Afu6g04920	NAD-dependent formate dehydrogenase	-4,3372774
Afu3g10750	acetate kinase, putative	-4,2552404
Afu7g05370	septin B	-4,0638313
Obsolete	Obsolete	-4,051623
Afu4g03490	tripeptidyl-peptidase (TppA), putative	-3,993904
Afu2g10660	mannitol-1-phosphate dehydrogenase	-3,9681616
Afu3g02585	conserved hypothetical protein	-3,810586
Afu6g13330	conserved hypothetical protein	-3,6108904
Afu3g08990	hypothetical protein	-3,608442
Afu1g06780	CBS and PB1 domain protein	-3,6010284
Afu8g05580	coenzyme A transferase PsecoA	-3,597566
Afu4g12930	ubiquinone biosynthesis monooxgenase (Coq6), putative	-3,5696566
Afu2g01190	proline rich protein, putative	-3,4667819
Afu2g16240	cell division control protein Cdc25, putative	-3,4656487
Afu3g09990	hypothetical protein	-3,454165
Afu1g15270	ATP-dependent Clp protease, putative	-3,4425147
Afu4g03830	hypothetical protein	-3,4302256
Afu1g16850	sur2 protein	-3,2778661
Afu1g07380	NADH-dependent glutamate synthase (GLT1), putative	-3,20804
Afu6g05140	sterol delta 5,6-desaturase ERG3	-3,162491
Afu5g09310	UPF0005 domain protein	-3,1045177
Afu6g07780	Copper fist DNA binding domain protein	-3,090794
Afu7g00250	tubulin beta-2 subunit	-3,0707166
Afu2g03920	G1 cyclin	-3,049343
Afu2g17000	PT repeat family	-3,0140874
Afu2g11340	ML domain protein, putative	-2,9671998
Afu6g12180	conserved hypothetical protein	-2,96711
Afu3g08010	C2H2 transcription factor (Ace1), putative	-2,9612324
Afu8g07130	antioxidant protein LsfA	-2,926409
Afu2g03300	hypothetical protein	-2,8645039
Afu1g04620	alcohol dehydrogenase, zinc-containing, putative	-2,8588543
Afu2g12100	hypothetical protein	-2,8304002
Afu1g14930	hypothetical protein	-2,8263364
Afu5g12840	hydroxyacylglutathione hydrolase, putative	-2,7744727
Afu1g07220	6-phosphofructo-2-kinase 1	-2,7511652
Afu1g09470	aminotransferase, class V, putative	-2,7465918
Afu2g14970	Gamma-butyrobetaine hydroxylase subfamily, putative	-2,734775
Afu5g03800	high-affinity iron permease CaFTR2	-2,722427
Afu3g11250	C2H2 transcription factor (Swi5), putative	-2,7180872
Afu5g07000	NAD binding Rossmann fold oxidoreductase, putative	-2,6339731

Continua

Conclusão		
Afu6g08440	protoporphyrinogen oxidase, putative	-2,6300273
Afu8g00960	cytochrome P450, putative	-2,5964372
Afu3g10370	conserved hypothetical protein	-2,3370152

APÊNDICE I. Genes mais expressos no micélio jovem de *Aspergillus fumigatus*, após 30 min de recuperação no escuro, depois da exposição à radiação UV por 30 min.

Locus	GeneN	Log_2(Cy5/Cy3)
Afu6g06470	heat shock protein, class I	3,6515033
Afu2g12630	allergen Asp F13	2,779333
Afu4g04280	AN1 zinc finger protein	2,6910534
Afu6g10470	zinc finger protein ZPR1	2,362108
Afu5g01650	bZIP transcription factor (JlbA), putative	2,3336928
Afu8g01710	antigenic thaumatin domain protein, putative	2,300082
Afu2g13060	calcineurin binding protein, putative	2,1820326
Afu6g04750	conserved hypothetical protein	2,1599524
Afu2g01720	hypothetical protein	2,1316307
Afu3g03060	cell wall protein (PhiA), putative	2,1278272
Afu4g04640	ubiquitin fusion degradation protein (Ufd1), putative	2,029763
Afu5g11430	quinone oxidoreductase, putative	1,9904655
Afu1g17120	elongation factor-1 gamma	1,9789908
Afu2g08370	glutathione S-transferase, putative	1,9340011
Afu1g14850	acyl-CoA dehydrogenase, putative	1,909565
Afu3g10530	protein serine/threonine kinase (Ran1), putative	1,8862841
Afu1g11180	ATP-dependent Clp protease, putative	1,8760016
Afu5g09200	ubiquitin conjugating enzyme (UbcC), putative	1,84132
Afu2g15960	nucleotide binding protein, putative	1,8100129
Afu1g07440	Hsp70 chaperone (Hsp70), putative	1,7962005
Afu4g09140	ornithine aminotransferase	1,7634784
Afu4g08810	DUF757 domain protein	1,7418563
Afu3g13160	hypothetical protein	1,6884981
Afu6g02020	hypothetical protein	1,5194451
Afu8g02430	NADP-dependent alcohol dehydrogenase	1,4844295
Afu4g10350	polyubiquitin (UbiD), putative	1,4537014
Afu5g06680	4-aminobutyrate aminotransferase	1,4510463
Afu1g03040	conserved hypothetical protein	1,4018998
Afu1g13620	oligopeptide transporter, OPT family, putative	1,3836802
Afu2g04870	dehydrogenase complex alpha subunit, putative	1,347008
Afu4g04490	conserved hypothetical protein	1,3099138
Afu4g03830	hypothetical protein	1,2786596
Afu5g09600	2-nitropropane dioxygenase family oxidoreductase, putative	1,2763593
Afu6g12180	conserved hypothetical protein	1,2457451
Afu1g13750	C2H2 transcription factor (Rpn4), putative	1,2088683
Afu6g14120	hypothetical protein	1,202732
Afu8g05530	soluble fumarate reductase (Osm1), putative	1,1856614
Afu5g09230	transaldolase	1,1852746
Afu2g15800	conserved hypothetical protein	1,1708672
Afu5g07000	NAD binding Rossmann fold oxidoreductase, putative	1,160049
Afu5g03010	conserved hypothetical protein	1,1557711
Afu6g02320	hypothetical protein	1,1263461
Afu5g06070	ABC multidrug transporter Mdr1	1,1225138

Continua

Conclusão		
Afu1g11220	GPI anchored protein, putative	1,1143966
Afu1g09940	protein required for survival at high temperature during stationary phase	1,1019002
Afu7g05490	hypothetical protein	1,0955371
Afu8g04890	hypothetical protein	1,0853063
Afu4g09110	cytochrome c peroxidase, putative	1,062198
Afu1g05050	cytosine deaminase, putative	1,0458661
Afu2g01170	1,3-beta-glucanosyltransferase Gel1	1,0378815
Afu3g05820	Zinc finger, ZZ type domain protein	1,0009785

APÊNDICE J. Genes mais reprimidos no micélio jovem de *Aspergillus fumigatus*, após 30 min de recuperação no escuro, depois da exposição à radiação UV por 30 min.

Locus	GeneN	Log_2(Cy5/Cy3)
Afu3g13660	Ctr copper transporter family protein	-3,2644846
Afu2g07680	L-ornithine N5-oxygenase	-3,2016566
Afu4g03940	ferric-chelate reductase, putative	-2,9442854
Afu1g09030	hypothetical protein	-2,7980835
Afu4g03930	cysteine synthase B, putative	-2,7173154
Afu3g11070	pyruvate decarboxylase PdcA, putative	-2,6547992
Afu5g06240	alcohol dehydrogenase, putative	-2,6501584
Afu3g05350	histone H2B	-2,6333506
Afu6g10660	ATP-citrat-lyase	-2,6312518
Afu1g07480	coproporphyrinogen III oxidase, putative	-2,575421
Afu2g05910	hexokinase Kxk, putative	-2,5605843
Afu1g05990	ribosomal protein L16a	-2,5603728
Afu3g13320	40S ribosomal protein S0, putative	-2,54815
Afu2g11940	adenylosuccinate lyase (Ade13), putative	-2,5049832
Afu8g05600	hypothetical protein	-2,4590242
Afu4g08420	hypothetical protein	-2,4476972
Afu2g09220	hypothetical protein	-2,4059448
Afu6g04920	NAD-dependent formate dehydrogenase	-2,350789
Afu1g12530	oleate delta-12 desaturase	-2,347063
Afu4g04190	hypothetical protein	-2,3468652
Afu1g12170	translation elongation factor EF-Tu, putative	-2,3423893
Afu4g03630	sterol 24-c-methyltransferase, putative	-2,335719
Afu1g03610	hypothetical protein	-2,3185759
Afu3g11740	conserved hypothetical protein	-2,3175137
Afu1g16280	mitochondrial F1F0-ATP synthase g subunit, putative	-2,3137262
Afu1g02030	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit EifCb, putative	-2,3127832
Afu1g05340	ribosomal protein S19	-2,2649705
Afu6g02750	nascent polypeptide-associated complex (NAC) subunit, putative	-2,264858
Afu5g02450	farnesyl-pyrophosphate synthetase	-2,2552614
Afu8g04370	GPI anchored protein, putative	-2,2361958
Afu2g13690	ubiquitin conjugating enzyme, putative	-2,2351956
Afu5g11820	conserved hypothetical protein	-2,215123
Afu2g11550	transmembrane domain-containing protein	-2,1557648
Afu2g10070	carbamoyl-phosphate synthase, large subunit	-2,1385899
Afu2g09490	eukaryotic initiation factor 4F subunit (eIF4F p130), putative	-2,1328478
Afu2g01660	mitochondrial outer membrane translocase receptor (TOM70), putative	-2,1256225
Afu1g13570	small nuclear ribonucleoprotein complex protein (Nhp2), putative	-2,1138277
Afu7g04190	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase, putative	-2,1100698
Afu5g07780	squalene monooxygenase Erg1	-2,102177
Afu2g11540	ketoreductase, putative	-2,1006236

Continua

Continuação

Afu4g04460	Ribosomal protein L13e	-2,097932
Afu3g05360	histone H2A	-2,0902224
Afu2g03120	cell wall glucanase (Utr2), putative	-2,0666265
Afu1g07630	zinc knuckle domain protein (Byr3), putative	-2,0630229
Afu2g13110	cytochrome c	-2,0383477
Afu8g01690	hypothetical protein	-2,0272706
Afu3g06970	cytosolic small ribosomal subunit S9, putative	-1,9972403
Afu3g11260	ubiquitin (UbiC), putative	-1,9924631
Afu2g03920	G1 cyclin	-1,9614508
Afu8g05260	nucleic acid-binding protein	-1,9488088
Afu5g04230	citrate synthase, eukaryotic	-1,9346703
Afu5g10650	pyridoxamine phosphate oxidase, putative	-1,9247347
Afu2g13530	translation elongation factor EF-2 subunit, putative	-1,9217798
Afu1g07690	protein O-mannosyl transferase	-1,9197377
Afu6g03830	ribosomal protein L14	-1,9145807
Afu4g12450	PH domain protein	-1,9132483
Afu3g04170	pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit, putative	-1,9106717
Afu6g13250	Ribosomal protein L31e	-1,9095577
Afu7g01220	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase, putative	-1,9093944
Afu5g09400	carbonyl reductase, putative	-1,9012924
Afu1g13000	conserved hypothetical protein	-1,8952228
Afu4g07360	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase	-1,89362
Afu4g03920	MFS drug transporter, putative	-1,8854386
Afu2g03730	Ctr copper transporter family protein	-1,8833681
Afu7g05070	FAD dependent oxidoreductase, putative	-1,882562
Afu3g09600	sik1 protein	-1,879625
Afu6g06770	enolase	-1,8665707
Afu1g14220	fibrillarin	-1,8597841
Afu2g16040	rRNA biogenesis protein, putative	-1,8596392
Afu4g08030	conserved hypothetical protein	-1,850422
Afu3g13310	conserved hypothetical protein	-1,8421662
Afu1g10630	S-adenosylmethionine synthetase	-1,83994
Afu3g08460	60s ribosomal protein l37b	-1,8305262
Afu1g14120	nuclear segregation protein (Bfr1), putative	-1,8294479
Afu4g11480	C2H2 finger domain protein, putative	-1,8276175
Afu4g03410	flavohemoprotein	-1,8127385
Afu5g02160	RNA binding protein (Arp), putative	-1,8070122
Afu2g13000	hypothetical protein	-1,7978531
Afu7g04690	FAD dependent sulfhydryl oxidase Erv2, putative	-1,7950128
Afu3g09320	serine hydroxymethyltransferase	-1,7881666
Afu4g08350	monosaccharide-P-dolichol utilization protein, putative	-1,7867769
Afu5g03080	septin	-1,7760963
Afu3g12300	Ribosomal L22e protein family	-1,76853
Afu5g13490	mitochondrial ribosomal protein L43, putative	-1,7620801
Afu4g07730	cytosolic large ribosomal subunit L11, putative	-1,7594141
Afu2g02150	ribosomal protein S10	-1,7558522
Afu3g07810	succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit	-1,7517107
Afu2g05950	snRNP and snoRNP protein (Snu13), putative	-1,7429135
Afu1g03950	cytochrome P450 sterol C-22 desaturase, putaitve	-1,740997
Afu4g07830	Ribosomal L38e protein family	-1,7341896

Continua

Continuação

Afu8g03940	ribosome recycling factor, putative	-1,7337098
Afu7g05710	hypothetical protein	-1,7336471
Afu2g01990	Signal recognition particle 14kD protein domain containing protein	-1,7336041
Afu4g10000	ABC multidrug transporter Mdr2	-1,7335557
Afu7g01460	ribosomal protein S5	-1,7244725
Afu7g04070	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	-1,7243627
Afu4g14380	conserved hypothetical protein	-1,7228681
Afu6g13370	SSU processome component (Utp10), putative	-1,7153881
Afu6g08630	hypothetical protein	-1,7145809
Afu5g11540	related to ribosomal protein S5	-1,6959057
Afu1g02150	glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GfdA), putative	-1,6956037
Afu3g11250	C2H2 transcription factor (Swi5), putative	-1,6952691
Afu3g09280	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit EifCk, putative	-1,6944236
Afu1g12590	Sla1p	-1,6874027
Afu3g13700	Transferase family family	-1,6628854
Afu4g03010	hypothetical protein	-1,6536893
Afu4g13170	guanine nucleotide-binding protein subunit, putative	-1,6503192
Afu1g12800	isocitrate dehydrogenase, NAD-dependent	-1,6370043
Afu4g13690	snoRNP protein (gar1), putative	-1,6369586
Afu6g04570	elongation factor 1-gamma 2	-1,6349343
Afu2g11520	MFS monosaccharide transporter, putative	-1,6316892
Afu3g10920	ribosome associated protein (Stm1), putative	-1,6234622
Afu3g04220	fatty acid synthase beta subunit, putative	-1,6204361
Afu1g04660	Ribosomal L15	-1,6198962
Afu5g02330	major allergen Asp F1	-1,6176718
Afu5g04220	mitochondrial DNA replication protein (Yhm2), putative	-1,6176344
Afu1g04190	polyadenylate-binding protein	-1,6121732
Afu2g10380	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit EifCl, putative	-1,6073508
Afu1g06780	CBS and PB1 domain protein	-1,6055887
Afu4g03880	60S ribosomal protein L7	-1,6052362
Afu2g02440	conserved hypothetical protein	-1,6024858
Afu1g04720	C-8 sterol isomerase (Erg-1), putative	-1,6000905
Afu1g15140	mitochondrial phosphate carrier protein (Mir1), putative	-1,5979038
Afu1g04530	Ribosomal L18ae protein family	-1,5940137
Afu1g10910	tubulin beta, putative	-1,5935751
Afu4g10410	aspartate aminotransferase, putative	-1,5887426
Afu2g09200	cytosolic large ribosomal subunit protein L30	-1,5782822
Afu3g07640	plasma membrane H -ATPase	-1,577461
Afu6g12720	cytosolic ribosomal protein (Rps29a), putative	-1,5772455
Afu2g15860	methyltransferase	-1,5735898
Afu6g13330	conserved hypothetical protein	-1,5688814
Afu4g03460	HLH DNA binding domain protein, putative	-1,5660592
Afu5g13390	conserved hypothetical protein	-1,5641849
Afu6g08580	FKBP-type peptidyl-prolyl isomerase, putative	-1,5614702
Afu3g08160	eukaryotic translation initiation factor eIF4A, putative	-1,5537075
Afu1g11860	mitochondrial import receptor subunit tom22	-1,5536789
Afu1g06960	pyruvate dehydrogenase complex alpha subunit, putative	-1,5525761
Afu2g09130	NADH-ubiquinone dehydrogenase 24 kDa subunit, putative	-1,5524958

Continua

Continuação

Afu6g08210	GINS DNA replication complex subunit Sld5, putative	-1,5509797
Afu5g02760	fatty acid elongase (Gns1), putative	-1,5444311
Afu4g03490	tripeptidyl-peptidase (TppA), putative	-1,543391
Afu1g03630	GPI anchored protein, putative	-1,5424182
Afu3g08640	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 2i, putative	-1,5422453
Afu2g04130	40s ribosomal protein s11	-1,5356886
Afu2g16820	curved DNA-binding protein	-1,5329278
Afu2g13720	RNA-polymerase I	-1,531789
Afu1g09410	ribosomal protein L17	-1,520963
Afu6g10700	Hsp10	-1,5152022
Afu1g10130	adenosylhomocysteinase	-1,5112127
Afu5g03020	60s ribosomal protein l2	-1,5076529
Afu3g09290	phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate-independent	-1,5070645
Afu6g10650	ATP citrate lyase, subunit 1, putative	-1,5051744
Afu5g08130	Protein transport protein SEC61 alpha subunit, putative	-1,5047868
Afu2g02320	Hsp70 chaperone (BiP), putative	-1,5026089
Afu1g14110	RNA polymerase subunit	-1,5014735
Afu1g10350	phosphoglycerate kinase	-1,4982742
Afu4g04550	conserved hypothetical protein	-1,4977381
Afu1g13780	histone H4	-1,4954232
Afu5g03640	mitochondrial export translocase Oxa1, putative	-1,4942621
Afu1g06570	mitochondrial ribosomal protein S2, putative	-1,4934651
Afu3g07140	flug protein	-1,4931974
Afu2g09210	ribosomal protein L10,e	-1,4914184
Afu6g00620	GPI anchored hypothetical protein	-1,4908721
Afu5g01940	R3H domain protein, putative	-1,486261
Afu4g12930	ubiquinone biosynthesis monooxgenase (Coq6), putative	-1,4787924
Afu2g02270	ribosomal protein S14p/S29e	-1,4767766
Afu8g02440	c-4 methyl sterol oxidase	-1,472566
Afu1g03110	ribosomal protein L29/heparin/heparan sulfate interacting protein	-1,4720812
Afu6g02260	hypothetical protein	-1,4673474
Afu7g01830	Ugp1	-1,466709
Afu5g06540	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit B17,2, putative	-1,4605507
Afu2g08670	acetyl-CoA carboxylase	-1,4587485
Afu5g06130	succinyl-CoA synthetase alpha subunit, putative	-1,4533559
Afu2g12740	conserved hypothetical protein	-1,4529076
Afu2g03010	cytochrome c subunit Vb, putative	-1,4438331
Afu6g03820	nascent polypeptide-associated complex (NAC) subunit, putative	-1,440295
Afu3g10120	TATA-box binding protein	-1,4391129
Afu4g10440	conserved hypothetical protein	-1,4372523
Afu6g07390	dehydrogenase	-1,4369107
Afu2g12190	mitochondrial intermembrane space translocase subunit Tim13, putative	-1,4268621
Afu3g05370	2-oxoglutarate dehydrogenase	-1,4267381
Afu5g10610	ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit precursor	-1,4249076
Afu3g10660	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	-1,419582
Afu2g08860	exosome complex endonuclease 2/ribosomal RNA processing protein	-1,406798

Continua

Continuação

Afu5g07380	nadh-ubiquinone oxidoreductase b12 subunit	-1,400364
Afu3g01110	GMP synthase	-1,3978546
Afu1g06610	ferredoxin-like iron-sulfur subunit of mitochondrial complex I	-1,3973902
Afu5g13300	aspartic endopeptidase Pep1	-1,3967069
Afu5g11620	pre-mRNA splicing factor RNA helicase (Prp43), putative	-1,3936917
Afu4g09000	mitochondrial 60S ribosomal protein L25, putative	-1,393041
Afu7g04430	ribosome biogenesis protein (Rrs1), putative	-1,391957
Afu2g04940	KH domain protein	-1,3905667
Afu2g13040	mitochondrial co-chaperone GrpE, putative	-1,3809994
Afu1g07220	6-phosphofructo-2-kinase 1	-1,3791511
Afu3g08770	mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase B16,6 subunit	-1,3763459
Afu1g12350	extracellular fruiting body protein, putative	-1,374178
Afu1g15820	fatty acid hydroxylase, putative	-1,3699348
Afu5g03300	hypothetical protein	-1,3696918
Afu7g05740	malate dehydrogenase, NAD-dependent	-1,3686401
Afu2g12910	PTAB	-1,3676155
Afu4g12920	histidyl-tRNA synthetase, mitochondrial precursor	-1,3663938
Afu6g04560	40S ribosomal protein S9, mitochondrial precursor	-1,3659767
Afu1g06320	DUF887 domain protein	-1,3653066
Afu3g05460	60S ribosomal protein L20, putative	-1,3641549
Afu1g14200	mitochondrial processing peptidase beta subunit, putative	-1,3601575
Afu1g10510	ribosomal protein L35, putative	-1,356873
Afu5g04370	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 Kd subunit, putative	-1,3501935
Afu5g07800	hypothetical protein	-1,3451087
Afu2g03700	HMG-CoA reductase	-1,3426818
Afu2g16500	conserved hypothetical protein	-1,342451
Afu1g09970	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit EifCh, putative	-1,3407047
Afu6g02090	ATP synthase subunit E, putative	-1,3405417
Afu1g04040	ubiquitin (UbiA), putative	-1,3381356
Afu2g13010	cytochrome c oxidase polypeptide vib	-1,3374658
Afu6g12790	NADH-ubiquinone oxidoreductase 39 kDa subunit, putative	-1,3360142
Afu1g05620	phenylalanyl-tRNA synthetase, beta subunit	-1,3333727
Afu1g13790	histone H3	-1,3331827
Afu7g05260	transformer-SR ribonucleoprotein	-1,3320407
Afu5g08830	HEX1	-1,3250357
Afu8g02770	cytidine deaminase, putative	-1,3238617
Afu6g07540	t-complex protein 1, epsilon subunit, putative	-1,3237188
Afu2g09290	antigenic mitochondrial protein HSP60, putative	-1,3203815
Afu6g02910	acetylglutamate kinase, putative	-1,3129474
Afu6g13490	glutamate decarboxylase	-1,3128887
Afu1g04370	hypothetical protein	-1,312048
Afu5g12100	pmt2 methyltransferase	-1,2975532
Afu1g09100	60S ribosomal protein L9 b	-1,2968377
Afu3g10820	metalloreductase, putative	-1,2967403
Afu7g03740	14-alpha sterol demethylase Cyp51B	-1,2945881
Afu4g07690	phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase	-1,2936735
Afu7g05720	pyruvate dehydrogenase complex	-1,2930883
Afu1g15590	succinate dehydrogenase membrane anchor subunit, putative	-1,2926261

Continua

Continuação

Afu6g02440	60s ribosomal protein L24, putative	-1,2883058
Afu2g12400	ATP synthase oligomycin sensitivity conferral protein, putative	-1,2862487
Afu2g09910	Fum16p	-1,2859397
Afu3g06450	protein mannosyltransferase 1	-1,285917
Afu6g04620	NADH-ubiquinone oxidoreductase B14 subunit, putative	-1,2838631
Afu5g10130	bZIP transcription factor, putative	-1,2834061
Afu1g04960	Leucine Rich Repeat domain protein	-1,2829772
Afu1g14180	methyltransferase (Ncl1), putative	-1,2825922
Afu6g11260	ribosomal protein L26	-1,2815276
Afu2g10580	hypothetical protein	-1,281006
Afu4g06790	ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kDa protein	-1,279753
Afu2g03610	IMP dehydrogenase, putative	-1,276549
Afu8g04650	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	-1,2738639
Afu5g03760	class III chitinase ChiA1	-1,269654
Afu1g09800	GTP-binding protein YchF	-1,2660633
Afu8g05320	mitochondrial F1 ATPase subunit alpha, putative	-1,2609092
Afu7g05920	stearic acid desaturase (SdeA), putative	-1,2576133
Afu6g13250	Ribosomal protein L31e	-1,2559611
Afu2g07990	hypothetical protein	-1,2558566
Afu3g06310	RNA binding protein	-1,2557428
Afu5g07890	Single-strand binding protein family domain protein	-1,253368
Afu4g04520	succinyl-CoA synthetase beta subunit, putative	-1,2510049
Afu4g07220	KH domain protein	-1,2463818
Afu5g05740	Golgi GDP-mannose transporter	-1,2460043
Afu6g13750	ferric-chelate reductase, putative	-1,2456782
Afu3g12370	Vacuolar ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit, putative	-1,2448046
Afu2g03590	Ribosomal protein S21e	-1,2439944
Afu3g06460	conserved hypothetical protein	-1,2421075
Afu1g05080	ribosomal protein P0	-1,2365124
Afu1g09330	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit EifCf, putative	-1,2349471
Afu5g06270	5-aminolevulinic acid synthase	-1,233177
Afu6g11310	bifunctional pyrimidine biosynthesis protein (PyrABCN), putative	-1,2314558
Afu7g05460	conserved hypothetical protein	-1,2303197
Afu4g07580	translation initiation factor EF-2 gamma subunit, putative	-1,2267247
Afu2g08570	small subunit of nuclear cap-binding protein complex	-1,2244121
Afu2g09650	aspartate transaminase, putative	-1,2241495
Afu5g05550	class V myosin (Myo4), putative	-1,2215856
Afu5g11390	APSES transcription factor, putative	-1,2199261
Afu3g14440	cytochrome c oxidase family protein	-1,2199094
Afu6g02370	ARP2/3 complex 20 kDa subunit (p20-ARC), putative	-1,2176211
Afu6g08850	ubiquinone biosynthesis methlytransferase Coq5, putative	-1,2160354
Afu4g04070	conserved hypothetical protein	-1,2157152
Afu1g02340	hypothetical protein	-1,2105808
Afu7g04490	Ribosomal protein S28e	-1,2074888
Afu5g03260	endosomal cargo receptor (Erp3), putative	-1,1957852
Afu6g02630	ATP dependent RNA helicase (Sub2), putative	-1,195584
Afu1g09550	dynein light chain (Tctex1), putative	-1,1911074
Afu3g09590	t-complex protein 1, zeta subunit, putative	-1,1908383

Continua

Continuação

Afu3g06760	ribosomal protein L37	-1,1858196
Afu2g07970	ribosomal protein L19	-1,1856409
Afu3g07430	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative	-1,1798513
Afu1g06790	importin beta-3 subunit, putative	-1,1765777
Afu6g05330	hypothetical protein	-1,175908
Afu1g16840	TCTP domain protein	-1,1734772
Afu7g02190	zinc knuckle nucleic acid binding protein, putative	-1,17268
Afu6g05200	Ribosomal L28e protein family	-1,1718106
Afu2g04700	RNA binding effector protein (Scp160), putative	-1,1707135
Afu6g02470	fumarate hydratase, putative	-1,1674675
Afu6g02450	ribosomal S30/ubiquitin fusion	-1,166461
Afu6g05140	sterol delta 5,6-desaturase ERG3	-1,1657295
Afu6g07770	alanine aminotransferase, putative	-1,1637683
Afu6g07290	endosomal cargo receptor (Erv14), putative	-1,1636174
Afu5g12530	conserved hypothetical protein	-1,1601683
Afu2g14670	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit EifCd, putative	-1,1597425
Afu2g11300	G2882	-1,1587762
Afu3g06960	60s ribosomal protein l21	-1,1579422
Afu5g13530	3'-5' exoribonuclease (Csl4), putative	-1,1569556
Afu3g13440	stomatin family protein	-1,1556255
Afu1g02070	cytochrome c1, heme protein precursor	-1,1502694
Afu6g06430	rRNA processing protein (Rrp20), putative	-1,148031
Afu8g04340	cystathionine gamma-lyase	-1,145099
Afu7g02360	hypothetical protein	-1,140181
Afu2g16880	ribosomal protein L37a	-1,1388723
Afu4g03050	profilin	-1,136981
Afu2g06230	glutamine amidotransferase:cyclase	-1,1364973
Afu6g08300	second largest subunit of RNA polymerase I	-1,1354897
Afu3g09910	phosphatidylinositol transporter, putative	-1,1347237
Afu1g12740	hypothetical protein	-1,1345884
Afu2g04820	translation release factor eRF3, putative	-1,134296
Afu8g02730	Density-regulated protein, putative	-1,1328979
Afu1g10670	Vacuolar ATP synthase subunit H, putative	-1,1285479
Afu2g01830	hypothetical protein	-1,1224276
Afu5g05960	serine/threonine protein kinase, putative	-1,1221873
Afu5g10560	cytochrome c oxidase subunit V	-1,1206732
Afu5g03670	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme	-1,1202024
Afu2g16120	translocon-associated protein, alpha subunit, putative	-1,1174937
Afu3g06190	Cytochrome c oxidase subunit VIa family	-1,1118574
Afu1g04320	ribosomal protein S8,e	-1,1079284
Afu2g10600	NADH-ubiquinone oxidoreductase 299 kDa subunit, putative	-1,1067152
Afu2g02310	sur7 protein, putative	-1,1053104
Afu2g08360	orotidine 5'-phosphate decarboxylase	-1,1036974
Afu8g02850	actin binding protein, putative	-1,1024065
Afu1g02550	tubulin alpha-1 subunit	-1,1020195
Afu1g11960	alternative NADH-dehydrogenase	-1,1016042
Afu2g12230	mitochondrial large ribosomal subunit protein L16, putative	-1,1015769
Afu3g06410	Coq4p	-1,0986
Afu1g12250	mitochondrial hypoxia responsive domain protein	-1,0978884

Continua

Conclusão

Afu4g09870	hypothetical protein	-1,0951673
Afu2g10440	ribosomal protein S14,e	-1,0946406
Afu7g04210	tropomyosin 1	-1,0925994
Afu5g06430	mitochondrial large ribosomal subunit L7, putative	-1,0795012
Afu4g11390	ubiquinol-cytochrome c reductase complex 17 kd protein	-1,0778149
Afu2g14970	Gamma-butyrobetaine hydroxylase subfamily, putative	-1,0772809
Afu7g05930	metallopeptidase MepB	-1,0623112
Afu5g05540	nucleosome assembly protein	-1,061957
Afu4g12600	phosphoribosyl-aminoimidazole carboxylase	-1,060238
Afu6g06840	hypothetical protein	-1,058924
Afu5g06150	hypothetical protein	-1,0579714
Afu3g10960	cell wall protein, putative	-1,055209
Afu4g03650	ribosome associated DnaJ chaperone Zuotin, putative	-1,0539503
Afu3g06240	hypothetical protein	-1,0532354
Afu7g02230	mRNA binding post-transcriptional regulator (Csx1), putative	-1,0526816
Afu5g04210	ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein 2, putative	-1,0502158
Afu6g00660	conserved hypothetical protein	-1,0459738
Afu5g08380	hypothetical protein	-1,0434242
Afu5g04320	RAB GTPase Ypt1, putative	-1,040767
Afu2g09510	hypothetical protein	-1,0386171
Afu4g12170	ribosomal protein L2	-1,0371248
Afu6g02240	protein kinase, putative	-1,0306926
Afu1g07090	conserved hypothetical protein	-1,0302988
Afu6g12170	FKBP-type peptidyl-prolyl isomerase, putative	-1,0271037
Afu1g08970	conserved hypothetical protein	-1,025161
Afu1g16190	cell wall glucanase Crf1	-1,0249281
Afu2g09960	mitochondrial Hsp70 chaperone (Ssc70), putative	-1,0236937
Afu3g13480	translation initiation factor 2 alpha subunit, putative	-1,0152094
Afu1g03390	60S ribosomal protein L12, putative	-1,0136503
Afu5g06390	adenosine kinase	-1,0115395
Afu1g02290	conserved hypothetical protein	-1,0115364
Afu1g08880	heavy metal ion transporter, putative	-1,011315
Afu1g11730	ADP-ribosylation factor, putative	-1,0106736
Afu2g16370	Ribosomal protein L32	-1,0081931
Afu1g12490	sexual development activator (VeA), putative	-1,0073597
Afu7g02310	adenine phosphoribosyltransferase 1	-1,00191
Afu5g08020	HLH DNA binding protein (Penr2), putative	-1,0014366
Afu1g12110	NADH:ubiquinone oxidoreductase (NADH dehydrogenase)	-1,0005758