



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

METABOLISMO DE ZINCO EM *Paracoccidioides brasiliensis*

Candidata: Nathalie Martelli de Paula
Orientadora: Dra. Célia Maria de Almeida Soares.
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Patologia Molecular.

Brasília-DF-Brasil

-2009-

TRABALHO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR, DO DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.

APOIO FINANCEIRO: CNPq e FINEPE/GENOPROT

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Silvia Maria Salem-Izacc

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília

SUPLENTE

Profa. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca

Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília

...Deixe que todos vejam que tipo de pessoa você é, então todos serão obrigados a se perguntarem: quem é este que faz pessoas como esta?

Conde Zinzerdoff

*... O que vale na vida não é o ponto de partida ou de chegada, e sim, a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.*

Cora Coralina

Dedico este trabalho...

...ao meu pai e minha mãe pelo amor incondicional e compreensão. Por terem me ensinado que pior que se decepcionar ao fim de um caminho, de algo chamado vida é nunca ter tentado percorrê-lo.

...Pai, mãe com a Graça de Deus vencemos mais uma batalha.

... aos meus irmãos Vivian, Frederico e a minha cunhada Lorena por todo incentivo e palavras carinhosas.

... Vivian não tenho palavras que sejam dignas de expressar o que sinto por você irmã. Obrigada por ter estado ao meu lado nos bons e maus momentos.

... ao Júlio César por todo carinho e compreensão. Por nunca ter me deixado desistir nem olhar para trás. Por toda fidelidade, por todo amor, por acreditar em mim.

Amo muito vocês

Obrigada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todo sopro de vida e coragem em momentos em que tudo parecia perdido. Por toda a sabedoria e por ter colocado ao meu lado pessoas especiais a ponto de me ajudarem nas mais diversas circunstâncias e a minha frente situações para que eu pudesse crescer, amadurecer e lá na frente mostrar que para vencermos basta o querer.

Professora Célia, gostaria de agradecê-la por todo incentivo e cooperação ao longo dos anos em que passamos juntas e dizer que valeu a pena cada segundo de LBM até aqui.

Ao meu amigo prá uma vida inteira Rodrigo Garavelo, por cada dia que vivemos juntos desde a graduação. Por ter me passado tantos ensinamentos e por todas gargalhadas. Saiba que sem você as minhas tardes nunca mais serão as mesmas. A você querido amigo as palavras Muito Obrigada não possuem muito valor... são pequenas demais perto de tudo que você fez e faz por mim.

Ao Neto por todas palavras sabias e amigas nas mais diversas situações. Ah você sabe... “Amigo é prá se guardar do lado esquerdo do peito”. Obrigada Netim.

A amiga Mônica Santiago por ter sido minha “mãe de bancada”. Moc muito obrigada por toda dedicação e por todos os ensinamentos.

Ao meu “chefinho” Betão, que me ajudou com tanta dedicação, a traçar cada experimento desenvolvido ao longo deste trabalho. Obrigadaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa por toda paciência, por tantos ensinamentos e pela nossa amizade verdadeira.

As minhas super amigas-irmãs Mariana, Kelleeeeeeee, Patrícia Kott, Patrícia Zambuzzi, Sarah, Sabrina e Cristina por terem me concedido momentos dos quais nunca irei me esquecer. Meninas saibam que me sinto honrada em poder chamar pessoas, assim como vocês de amigas.

Aos amigos presença Dayane, Leandro, Patrícia Lima e Renatinha por todo companheirismo ao longo dos nossos anos de mestrado.

Aos amigos Ronney e Dacie por todo incentivo ao longo deste trabalho e por toda ajuda durante as disciplinas. Ronney obrigada por tudo desde quando eu entrei no LBM. A você serei grata por toda vida.

As borboletas Juliana, Elisa Flávia e Mirelle Bailão por terem me auxiliado nos primeiros passos do meu mestrado.

A Hérika por ter sido mais do que uma companheira de bancada.

Agradeço ainda de forma sincera a todos outros alunos do LBM por toda colaboração ao longo dos anos.

A secretaria da Pós-graduação. Dani, Jaque e Alessandro muito obrigada por toda ajuda durante esses anos.

Enfim, a todos vocês que ajudaram de uma forma ou outra na execução deste trabalho

Meus sinceros agradecimentos.

Sumário

	Página
RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVII
I. INTRODUÇÃO	
I.1-Biologia e aspectos gerais do fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .	18
I.2-Paracoccidioidomicose (PCM).	21
I.3-Homeostase de zinco-Aspectos Gerais.	22
1.4-Transportadores de zinco de alta e de baixa afinidade (Zrt1/Zrt2) em <i>P. brasiliensis</i> .	34
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	
II-Justificativa.	36
III-Objetivos.	37
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	
IV.1-Fluxograma.	38
IV.2-Microrganismo e crescimento.	39
IV.3-Rastreamento e identificação <i>in silico</i> de genes relacionados à manutenção da homeostase de zinco em <i>P. brasiliensis</i>	39
IV.4-Análises de Bioinformática.	40
IV.5-Cultivo de células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> em diferentes concentrações de sulfato de zinco	40
IV.6-Experimentos de depleção de zinco em <i>P. brasiliensis</i> .	45

IV.7-Experimentos de depleção de ferro e cobre em <i>P. brasiliensis</i> .	46
VI.8-Infecção Experimental.	48
VI.9-Extração de RNA (Trizol®).	48
VI.10-Síntese de cDNA.	50
VI.11-Análise da Expressão gênica por RT-PCR quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR).	50

V. RESULTADOS

V.1- Rastreamento e identificação <i>in silico</i> de genes relacionados à manutenção da homeostase de zinco em <i>P. brasiliensis</i> .	53
V.2-Análises de identidade e similaridade das seqüências deduzidas de <i>PbZrt1</i> e <i>PbZrt2</i> em três isolados de <i>P. brasiliensis</i> .	55
V.3-Análise da expressão dos transportadores de alta e de baixa afinidade de ferro e zinco em células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> cultivadas em diferentes concentrações de zinco.	59
V.4-Experimentos de depleção de zinco em <i>P. brasiliensis</i> .	60
V.5-Análise da expressão dos possíveis genes envolvidos na homeostase de zinco durante a depleção de ferro e cobre em <i>P. brasiliensis</i> .	63
V.6-Perfil da expressão de genes codificantes para os transportadores de alta e de baixa afinidade de ferro e zinco em células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> derivadas de baço de animais infectados.	66

VI.DISSCUSSÃO

VII.PERSPECTIVAS

VIII.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Índice de Figuras

	Página
<u>Figura 1</u> : Topologia predita para os transportadores da família Zip.	29
<u>Figura 2</u> : Possível rota metabólica percorrida por átomos de zinco em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	31
<u>Figura 3</u> : Fluxograma representativo das metas experimentais realizadas neste trabalho.	38
<u>Figura 4</u> : Condições de cultivo de <i>P. brasiliensis</i> em diferentes concentrações de zinco.	44
<u>Figura 5</u> : Condições de cultivo de <i>P. brasiliensis</i> durante a privação de zinco.	46
<u>Figura 6</u> : Condições de cultivo de <i>P. brasiliensis</i> durante a privação de ferro e cobre.	47
<u>Figura 7</u> : Possível via de homeostase zinco utilizada pelo fungo <i>P. brasiliensis</i> .	54
<u>Figura 8</u> : Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos de Zrt1 do isolado Pb01 com proteínas homólogas em <i>P. brasiliensis</i> .	56
<u>Figura 9</u> : Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos de Zrt2 do isolado Pb01 com proteínas homólogas em <i>P. brasiliensis</i> .	57
<u>Figura 10</u> : Análise da expressão dos genes <i>Pbzrt1</i> e <i>Pbzrt2</i> em diferentes concentrações de sulfato de zinco.	60
<u>Figura 11</u> : Viabilidade celular de <i>P. brasiliensis</i> na presença do quelante de zinco (TPEN).	61
<u>Figura 12</u> : Análise da expressão gênica de <i>Pbzrt1</i> em condições de depleção de zinco em <i>P. brasiliensis</i> .	62
<u>Figura 13</u> : Análise da expressão de genes envolvidos na manutenção da homeostase de ferro e zinco em <i>P. brasiliensis</i> .	63
<u>Figura 14</u> : Análise da expressão de genes envolvidos na via de homeostase de zinco em células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> cultivadas na ausência de ferro e cobre.	65
<u>Figura 15</u> : Análise da expressão dos genes <i>Pbzrt1</i> e <i>Pbzrt2</i> durante o processo infectivo.	66

Índice de Tabelas

	Página
Tabela 1: Tampão Fosfato 10 X.	41
Tabela 2: Meio Mínimo Mc Veigh & Morton (MMcM).	41
Tabela 3: Solução de Vitaminas.	42
Tabela 4: Solução de Elementos Traços.	43
Tabela 5: Oligonucleotídeos utilizados para análise de expressão gênica por qRT-PCR em tempo real.	52
Tabela 6: Identidade e similaridade das sequências deduzidas de aminoácidos referentes às possíveis proteínas envolvidas na homeostase de zinco em <i>P. brasiliensis</i> .	58

Lista de Abreviaturas

ADI- domínio de ativação 1

ADII- domínio de ativação 2

Aft1- Regulador transcricional ferro-responsivo 1

Aft2- Regulador transcricional ferro-responsivo 2

ATP- adenosina trifosfato

BCS- batocuproinadisulfonato sódico

BHI- *Brain Heart Infusion*

BPS- batofenantrolinadisulfonato sódico

Broad- *Bioimage Benchmark Collection*

C₂h₂- motivos ricos em dedos de zinco

Calcium/Ca- transportador de cálcio e zinco

Ccch- transportador de cátion divalente

Cd²⁺- íons cádmio

CDF- facilitador da difusão de cátions

Cdf- transportador de zinco intravacuolar em *P. brasiliensis*

cDNA- DNA complementar

Co²⁺- íons cobalto

Cot1- transportador de Zn²⁺/Co²⁺ intracelular

Crs1- fator de transcrição zinco-responsivo em *Candida albicans*

dATP- desoxiadenosina trifosfato

dCTP- desoxicitosina trifosfato

DEPC- dimetil pirocarbonato

dGTP- desoxiguanosina trifosfato

DNA- ácido desorribonucléico

DTT- ditioneitol

dTTP- timina trifosfato

Fe²⁺ - íon ferroso/estado reduzido

Fe³⁺ - íon férrico/estado oxidado

Fet3- sistema de alta afinidade multicobre-oxidase

Fet4- transportador de Fe²⁺ de baixa afinidade

Frt1- sistema de transporte de íons ferro de alta afinidade

g- força gravitacional

g- gramas

Gata- proteína zinco-dependente

GCPSR- método de reconhecimento de espécies filogenéticas

h- hora

HCl- ácido clorídrico

Irt- transportador regulado por ferro

ITS- sequência espaçadora interna

M- molar

Mb- megabases

mg- miligramas

MgCl₂- cloreto de magnésio

min- minutos

mL- mililitro

mM- milimolar

µg- micrograma

µM- micromolar

MMcM- meio de cultura McVeigh & Morton

mRNA- RNA mensageiro

Msc2- transportador de Zn²⁺ de Retículo Endoplasmático

Mtf-1- fator de transcrição de humanos metal-responsivo 1

N- mol

Na₂PO₄- fosfato de

NaOH- hidróxido de sódio

NCBI- Centro Nacional de Informação por Biotecnologia

°C- graus Celsius

Pb- Paracoccidioides brasiliensis

PBS- solução de tampão fosfato

PCM- paracoccidioidomicose

PCR- reação em cadeia da polimerase

PFGE- gel em eletroforese de pulso alternado

pH- potencial hidrogeniônico

PS2- espécie filogenética 2

PS3- espécie filogenética 3

qRT-PCR- reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

RDA- análise de diferença representacional

RNA- ácido ribonucléico

rpm- rotações por min

s- segundos

S1- espécie 1

TPEN- [N,N,N,_,N_ - tetrakis (2-pyridil-metil)ethylenediamine]

Zap1- Regulador transcricional zinco-responsivo 1

ZfaA- fator de transcrição zinco-responsivo em *A. fumigatus*

ZIP- prote´nas Zrt e Irt

Zn²⁺ - íons zinco

ZnSO₄- sulfato de zinco

ZnT1- transportador humano de zinco 1

ZnuA- proteína de ligação periplasmática

ZnuABC- sistema de captura de íons zinco ABC

ZnuB- proteína membrana integral

ZnuC- componente ATPase

Zrc1- transportador de Zn²⁺ intracelular

ZRES- elementos zinco-responsivos

ZrfA- transportador de alta afinidade de zinco em *Aspergillus fumigatus*

ZrfB- transportador de baixa afinidade de zinco em *A. fumigatus*

Zrt- transportador regulado por zinco

Zrt1- transportador de alta afinidade de zinco

Zrt2- transportador de baixa afinidade de zinco

Zrt3- transportador de zinco intravacuolar

Resumo

O fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é agente etiológico da paracoccidioidomicose, uma micose sistêmica de alta incidência em países latino americanos. O processo infeccioso ocasionado por esse microrganismo é marcado pela conversão do fungo de uma forma não patogênica para uma forma patogênica, leveduriforme. O estabelecimento e o sucesso do processo infeccioso estão relacionados com a aquisição de micronutrientes essenciais, como o zinco, ferro e cobre, os quais são requeridos como cofatores em vários processos biológicos essenciais como a respiração, crescimento do organismo e composição de proteínas. Estudos prévios desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram que os genes codificantes dos transportadores de alta (*PbZrt1*) e de baixa afinidade (*PbZrt2*) de ferro e zinco são moléculas induzidas durante o processo infectivo do fungo *P. brasiliensis* em modelo animal. No presente estudo foram realizadas análises *in silico* no banco de dados do genoma estrutural de *P. brasiliensis* (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html), nas quais possíveis genes envolvidos na homeostase de zinco foram identificados e utilizados para a elaboração de um provável modelo de manutenção da homeostase de zinco em *P. brasiliensis*. A técnica qRT-PCR em tempo real foi usada para avaliar o perfil de expressão dos genes *Pbzrt1* e *Pbzrt2*, bem como de outros genes possivelmente envolvidos na homeostase de zinco, durante a exposição de células leveduriformes do referido fungo, nas seguintes condições de cultivo: diferentes concentrações de ZnSO₄, depleção de zinco, depleção de ferro e depleção de cobre. qRT-PCR em tempo real foi utilizada ainda para analisar a expressão dos genes *Pbzrt1* e *Pbzrt2* em células leveduriformes de *P. brasiliensis* derivadas de baço infectado, durante 15 dias. Os dados obtidos ao fim desse trabalho sugerem tanto a relação entre íons zinco e ferro na homeostase de zinco, quanto a importância do transportador de alta afinidade de ferro e zinco *PbZrt1* durante o processo infeccioso.

Palavras chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, transporte de ferro e zinco e homeostase de zinco.

Abstract

The thermally dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the agent responsible for causing paracoccidioidomycosis, a common systemic mycosis in Latin America. The infectious process is characterized by the fungus conversion from a non-pathogenic to a pathogenic form. The infectious process establishment depends on the acquisition of essential micronutrients such as zinc, iron and copper, which are required as cofactors in several biological processes such as respiration, fungal growth and protein maturation. Previous studies developed in our laboratory showed the genes coding for high (*PbZrt1*) and low (*PbZrt2*) affinity iron and zinc transporters are induced during the infective process caused by *P. brasiliensis* in animal model. In the present study *in silico* analysis was performed on the database of the structural genome of *P. brasiliensis* (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html).

Genes involved in maintaining the homeostasis of zinc have been identified and used for the development of a probable model of zinc homeostasis in *P. brasiliensis*. The technique of real time qRT-PCR was used to evaluate the expression profile of *Pbzrt1* and *Pbzrt2* and the probable genes involved in zinc homeostasis during exposure of yeast cells of *P. brasiliensis* to different concentrations of ZnSO₄, as well as in absence of zinc, iron and copper. Real time qRT-PCR was also used to analyze the expression of *Pbzrt1* and *Pbzrt2* in yeast cells of *P. brasiliensis* derived from spleen of infected mice. All together data of this study suggest the relationship between zinc and iron ions in the homeostasis of zinc and the importance of high-affinity transporter of iron and zinc during the infectious process.

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*, zinc and iron transport and zinc homeostasis.

I- Introdução

I.1- Biologia e aspectos gerais do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo termodimórfico que compõe o filo Ascomycota junto aos seguintes fungos termodimórficos *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenkii* e *Penicillium marneffeii*. O processo infeccioso ocasionado por esses fungos é marcado pela conversão desses microrganismos de uma forma não patogênica presente, na natureza, facilmente encontrados no solo para uma forma patogênica que é essencialmente distinta morfológicamente. Assim humanos e outros animais são infectados por esses microrganismos quando esporos ou fragmentos presentes no solo são inalados e uma vez presentes nas vias respiratórias do hospedeiro convertem-se para a forma patogênica, ou leveduriforme, iniciando uma possível micose sistêmica (San-Blas & Niño Vega, 2004; Nemecek *et al.*, 2006).

P. brasiliensis é agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), tendo sendo descrito no ano de 1908 por Adolph Lutz. Esse microrganismo é encontrado em condições ambientais ou quando cultivado *in vitro* em temperaturas inferiores a 28°C sob a forma miceliana. Em contrapartida, quando presente em tecidos infectados ou quando cultivado em temperaturas variando entre 28°C e 37°C esse microrganismo é encontrado sob a forma leveduriforme. A forma miceliana de *P. brasiliensis* é caracterizada por hifas septadas, com a presença de conídios terminais ou intercalares. Já as células leveduriformes são caracterizadas por serem constituídas por múltiplos brotamentos originados de uma célula-mãe, onde uma célula central e grande é circundada por células periféricas menores, apresentando uma estrutura semelhante a uma roda de leme de navio (San-Blas *et al.*, 2002; Restrepo *et al.*, 2008).

Embora, a forma sexuada do fungo *P. brasiliensis* permaneça desconhecida, análises filogenéticas, que ao longo dos anos vem sendo de extrema importância para a classificação dos fungos utilizando como ferramentas básicas tanto o RNA, quanto o DNA ribossomal (James *et al.*, 1996), atualmente classificam taxonomicamente esse patógeno como pertencente ao reino Fungi, filo Ascomycota, subdivisão Euscomycotina, classe Plectomyceto, subclasse Euscomycetidae, ordem Onygenales, família Onygenaceae, subfamília Onygenaceae Anamórficos, gênero Paracoccidioides, espécie única *Paracoccidioides brasiliensis* (San-Blas *et al.*, 2002).

Estudos baseados em dados de polimorfismo genético identificaram três linhagens distintas de *P. brasiliensis* S1 (espécie 1), PS2 (espécie filogenética 2), PS3 (espécie filogenética 3) e que por sua vez diferem do isolado *Pb01* (Carrero *et al.*, 2008). PS3 é possivelmente um grupo monofilético tendo sido encontrado apenas na Colômbia, em contrapartida a linhagem S1 que tem como representante o isolado *Pb18*, encontrada no Brasil, Venezuela, Argentina, Paraguai e Peru. Isolados de PS2 também foram encontrados no Brasil e na Venezuela. É relevante o fato que todos os três grupos possuem a capacidade de induzir a PCM tanto em humanos, quanto em outros mamíferos; no entanto PS2 apresentou menor virulência (Matute *et al.*, 2006). Carrero *et al.* (2008), discutiram as relações filogenéticas entre esses isolados, através de análises realizadas com base na comparação de sequências de regiões codantes, não codantes e regiões ribossômicas, ITS (sequência espaçadora interna) de sete novos isolados e 14 isolados previamente conhecidos. Todos os isolados se agrupam nos três grupos filogenéticos descritos acima e diferem apenas do isolado *Pb01*, o que sugere que esse isolado possa ser uma nova espécie do gênero Paracoccidioides. Diante desses resultados Teixeira *et al.* (2009), prosseguiram os estudos iniciados por Matute *et al.* (2006), com o objetivo de estudarem o status taxonômico do isolado *Pb01*, via concordância genealógica pelo Método de Reconhecimento de Espécies Filogenéticas

(GCPSR) e sugeriram que o isolado *Pb01* deve ser classificado como um novo grupo filogenético, propondo que a espécie se chame *Paracoccidioides lutzii*.

A organização genômica de *P. brasiliensis* tem sido esclarecida. Feitosa *et al.* (2003), através de análises de gel em eletroforese de pulso alternado (PFGE) identificaram de quatro a cinco cromossomos com 2-10Mb de doze isolados clínicos do fungo de diferentes regiões geográficas. Diante disso, estima-se que esse microrganismo possua um genoma variando de 23 a 31 Mb. Almeida *et al.* (2007), através de estudos analisando conídios e leveduras de dez isolados de *P. brasiliensis* provenientes de diferentes áreas geográficas, via citometria de fluxo, observaram que os conídios possuem um genoma que varia entre 26,3 a 35,5 Mb e que leveduras possuem um genoma entre 30,2 a 30,9 Mb, concluindo que não há diferença significativa entre células micelianas e leveduriformes.

Foi realizado o genoma estrutural dos isolados *Pb01*, *Pb03* e *Pb18* o que confirmou que cada isolado possui cinco cromossomos. Foi observado ainda que o isolado *Pb01* apresenta o maior genoma tanto em número de bases, quanto em quantidade de genes, quando comparado como outros dois isolados. As sequências geradas estão depositadas em um banco de dados do projeto `Fungal Genome Initiative` (<http://www.broad.mit.edu/science/projects/msc/data-release-summary>). O fungo *P. brasiliensis* assim como os fungos dimórficos citados acima, geralmente são encontrados em áreas geográficas restritas também conhecidas como reservárias, em que fatores como o clima e o solo, provavelmente contribuem na adaptação dos fungos nesse ambiente (Nemecek *et al.*, 2006). Ainda não se determinou ao certo o nicho ecológico de *P. brasiliensis*, embora várias hipóteses tenham sido postuladas ao longo dos anos. Uma delas sugere que o fungo viva de forma saprobiótica na natureza, por já ter sido isolado de plantas, solo e água (Restrepo *et al.*, 2001). Terçarioli *et al.* (2007), através do cultivo de alguns isolados do fungo, demonstraram que o mesmo pode se desenvolver tanto em solos argilosos, quanto em solos arenosos quando

na presença de umidade o que é confirmado pela ocorrência desse patógeno em solos típicos de agricultura.

Conti-Diaz (2007), não só propõe a ocorrência do fungo *P. brasiliensis* em ambientes próximos a rios, onde possa ter como possíveis hospedeiros espécies aquáticas heterotérmicas, como moluscos, anfíbios, peixes e artrópodes, como discute o fato de que animais domésticos e silvestres não podem ser considerados reservas naturais do fungo pelo fato dos mesmos serem infectados por esse microrganismo. Ainda estudos utilizando animais silvestres mortos foram realizados por Rinchini-Pereira *et al.*, (2007) confirmando através de Nested-PCR (reação da cadeia em polimerase) e oligonucleotídeos específicos para o fungo, a presença desse microrganismo em animais, como tatu (*Dasypus sp.*), porco-da-índia (*Cavia aperea*), porco espinho (*Sphigurrus spinosus*), guaxinim (*Procyon cancrivorus*) e furão (*Gallictis vittata*).

I.2- Paracoccidioidomicose (PCM)

A PCM é caracterizada por ser uma micose sistêmica e granulomatosa (Ramos-e-Silva & Saraiva, 2008). O primeiro contato parasito-hospedeiro se dá nos alvéolos pulmonares. A partir dos pulmões o fungo pode alcançar outros órgãos e sistemas, como fígado, baço e sistema nervoso central, tanto através da via hematogênica, quanto através da via linfática (San-Blas, 1993; Valera *et al.*, 2008).

Relatos atuais indicam que em países Latino-Americanos cerca de 10.000 pessoas já foram acometidas pela PCM e apenas 2% desses indivíduos desenvolvem a doença (Ramos-e-Silva & Saraiva, 2008). No Brasil essa micose foi considerada a oitava moléstia, entre infecções crônicas e doenças parasitárias, que levam o indivíduo a óbito (Taborda *et al.*, 2008). A referida micose ainda foi descrita em países, como Chile, Guatemala, Belize e Antilhas, como casos autóctones (Ramos-e-Silva & Saraiva, 2008).

A infecção é adquirida nas duas primeiras décadas de vida, principalmente em indivíduos entre 10 e 20 anos, embora as manifestações clínicas da doença possam ocorrer em adultos, geralmente imunocomprometidos, entre 30 e 50 anos, como reativação de foco endógeno latente. O progresso da doença e a diversidade das formas clínicas ainda dependem da virulência apresentada pelos diversos tipos de isolados do fungo. Dessa forma, a PCM apresenta-se sob duas formas clínicas principais: forma aguda ou subaguda (juvenil) e forma crônica (adulta) (San-Blas & Niño-Vega, 2001; Ramos-e-Silva & Saraiva, 2008).

Assume-se que o trabalho com solo e plantações em área rural seja fator ocupacional predisponente para a aquisição da PCM (Franco 1987, Brummer *et al.*, 1993; Restrepo *et al.*, 2008). A incidência da doença até a puberdade é a mesma em ambos os sexos, porém na fase adulta, mais de 80% dos indivíduos acometidos são do sexo masculino. Estudos iniciados realizados por Sano *et al.* (1999) e relatos atuais de Fortes *et al.*, (2009), sugerem uma ação protetora conferida pelos hormônios estrógenos presentes no sexo feminino.

I.3- Homeostase de zinco – Aspectos Gerais

Os íons metálicos são elementos vitais que participam de inúmeros processos metabólicos em todos os tipos celulares, sendo ligados diretamente ao metabolismo do DNA e ao processamento pós-transcricional da maioria das proteínas. Em microrganismos patogênicos os íons metálicos ainda garantem uma colonização bem sucedida do parasita no hospedeiro. Dessa forma, é de extrema importância para o bom funcionamento celular que haja tanto a distribuição correta dos metais, quanto sua devida concentração, nos compartimentos intracelulares, já que aparentemente qualquer distúrbio na concentração de íons metálicos em meio intracelular pode causar danos a elementos metabólicos vitais, geralmente acarretando em morte celular (Nelson, 1999).

Zinco, ferro e cobre, são os três metais mais prevalentes em sistemas biológicos, embora em grandes quantidades em meio intracelular, se tornam agentes potencialmente tóxicos. Dessa forma, as células em geral, desenvolveram mecanismos homeostáticos que garantem as concentrações necessárias dos metais para a sobrevivência celular. Uma série desses mecanismos homeostáticos já foram identificados e estudados, dentre eles o controle da transcrição de genes envolvidos na aquisição, distribuição e armazenamento de metais (Rutherford *et al.*, 2004). O mecanismo de como o zinco gera toxicidade à célula não é conhecido, porém sabe-se que o íon metálico é capaz de se acoplar em ligantes intracelulares inapropriados, ou, por exemplo, competir com outros metais por sítios ativos enzimáticos (Gaither & Eide, 2001).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido estabelecida como organismo modelo para o entendimento dos mecanismos fisiológicos e moleculares responsáveis pela manutenção da homeostase intracelular de íons metálicos, dentre eles ferro, zinco e cobre. Estudos iniciais sugeriram que a captura de metais é mediada por um conjunto de transportadores específicos, para cada metal. Geralmente, esse conjunto de transportadores é composto por uma permease de alta afinidade, que é expressa somente em condições limitantes do íon metálico e por uma permease de baixa afinidade, que é expressa em condições em que é abundante a concentração do íon metálico. Em meio intracelular, duas formas de garantir a homeostase dos metais captados por seus respectivos transportadores, são conduzir esses metais para o lúmen de organelas ou imobilizá-los até estruturas conhecidas por vacúolos (Desbrosses *et al.*, 2005). Estudos em *S. cerevisiae*, identificaram uma grande quantidade de famílias gênicas atuantes no transporte de íons metálicos e que possuem similaridade com proteínas relacionadas a esse processo de captação de metais em plantas e animais (Van Ho *et al.*, 2002).

Investigações envolvendo o mecanismo de autofagia vêm demonstrando sua importância em vários processos biológicos, entre eles: adaptação, diferenciação e desenvolvimento celular. A homeostase de íons metálicos, visando tanto à adaptação celular em relação a nutrientes específicos, quanto à sobrevivência dos organismos em condições de estresse está relacionada ao processo de autofagia (Onodera & Ohsumi, 2005). Os organismos de forma geral possuem mecanismos que visam a homeostase para garantir que quantidades mínimas de metais essenciais estejam disponíveis para o estabelecimento de sua cascata metabólica. Estudos realizados por Richie *et al.* (2008), com o fungo filamentosso *Aspergillus fumigatus* indicaram que a autofagia está entre esses mecanismos. Foi demonstrado que esse fungo quando cultivado em meio com depleção de metal, apresentava deficiência em seu crescimento, passando a realizar processos de autofagia, reciclando proteínas associadas a metais pré-existentes. Assim, foi observado que há a liberação dos íons metálicos, deixando-os livres para a utilização em processos metabólicos essenciais para o crescimento do fungo e restabelecimento da homeostase. Como forma de comprovar os resultados obtidos o mesmo experimento de crescimento do fungo, em meio com depleção de metais, foi realizado com meio acrescido de metais, como zinco, magnésio e cobre em que foi observado que o crescimento do fungo foi normalizado.

O comportamento de microrganismos eucariotos, em ambiente privado de metal, vem demonstrando que os sistemas regulatórios envolvidos na aquisição de metais funcionam em rede (Rutherford & Bird, 2004), o que durante o processo infectivo é de extrema importância. Estudos recentes, como o realizado por Dainty *et al.* (2008), em *Schizosacharomyces pombe*, confirmam os estudos de Waters & Eide (2002), que demonstraram que a permease de baixa afinidade de ferro, Fet4 (*low-affinity Fe²⁺ transporter*), é regulada por múltiplos sinais que levam à modulação de sua expressão em resposta ao ferro, zinco e oxigênio, em leveduras. Paganí *et al.* (2007), demonstraram em *S.*

cerevisiae, que a inativação do gene, *arf1* (*iron-responsive transcriptional regulator 1*), fator transcricional requerido na resposta à privação de ferro, acarreta sensibilidade da levedura a altas concentrações de zinco. Sabiha *et al.* (2009), ao estudarem o comportamento de *A. fumigatus*, em meio com ausência de íons ferro, observaram que assim como em *S. cerevisiae*, o fungo fica susceptível a concentrações de zinco o que influencia tanto na captação de ferro por sideróforos, quanto na sobrevivência do fungo.

Os átomos de ferro são disponíveis em dois estados ionizantes, Fe^{3+} (íon férrico/estado oxidado), sendo esse estado insolúvel, portanto não reativo e Fe^{2+} (íon ferroso/estado reduzido), sendo esse estado solúvel e reativo (Ibrahim *et al.*, 2008). Essa habilidade apresentada pelos íons ferro em ocupar múltiplos sítios de valência de forma estável o torna um micronutriente essencial por ser participante de reações ácido-base (Sutak *et al.*, 2008) e cofator de inúmeras enzimas, incluindo as metaloproteínas que estão envolvidas na transferência de elétrons (Frausto da Silva & Williams, 2001; Jbel *et al.*, 2009). Essas enzimas dependentes de ferro são essenciais em inúmeros processos bioquímicos, como, por exemplo, a respiração, o ciclo do ácido tricarboxílico, fotossíntese e fixação do nitrogênio (Haas *et al.*, 2008). Por outro lado, essa mesma propriedade redox conferida ao ferro, gera toxicidade à célula quando há a formação de espécies reativas de oxigênio via reação de Fenton (Halliwell *et al.*, 1992; Jbel *et al.*, 2009). Assim, mecanismos celulares que envolvem o transporte e a utilização de ferro devem ser precisamente regulados de acordo com a disponibilidade e a quantidade de ferro necessária para a célula (Philpott, 2006).

Diante do importante papel desse íon metálico, o fato dos íons Fe^{3+} serem pouco disponíveis principalmente em tecidos do hospedeiro e de sua natureza insolúvel tanto na presença de oxigênio, quanto em pH fisiológico, os microrganismos de forma geral desenvolveram diversos mecanismos específicos que mediam a captação de íons ferro, o que contribui para a sobrevivência e muitas vezes para a virulência desses organismos. Dentre

esses mecanismos foram observadas três estratégias comuns que aumentam a solubilidade desse metal, nesses organismos: a acidificação do ambiente no qual estão inseridos, a redução dos íons férricos para íons ferrosos e a secreção de moléculas solúveis que captam ferro, os sideróforos. Os sideróforos são pequenas moléculas orgânicas que possuem uma alta afinidade por ferro o que contribui para uma maior captação desses íons. Em fungos patogênicos essas moléculas captam íons de ferro ligados a proteínas do hospedeiro, como lactoferrinas, transferrinas e ferritinas, sendo consideradas um importante fator de virulência (Chipperfield & Ratlege, 2000; Sutak *et al.*, 2008).

Em *S. cerevisiae* sistemas celulares envolvendo o metabolismo de ferro são bem compreendidos, o que facilitou para que estudos sobre a homeostasia desse íon metálico fossem iniciados em outros fungos. Em geral, estão presentes sistemas de alta e de baixa afinidade de ferro, conhecidos por sistemas redutivos, sendo o complexo formado pelas permeases Fet3 (*high-affinity system multicopper ferroxidase*) e Frt1 (*high-affinity system iron transporter*) responsável pela captação de ferro por alta afinidade, enquanto a permease Fet4 é responsável pela captação de ferro de baixa afinidade. Esses sistemas, assim como outros sistemas de captação, são regulados de acordo com a presença do íon metálico no ambiente extracelular e pelos ativadores transcricionais ferro dependentes, Aft1 e Aft2 (*iron-responsive transcriptional regulator 2*) (Philpott, 2006). Rutherford & Bird, (2004), discutiram que em experimentos previamente realizados com mutantes para os genes *aft1* e *aft2* utilizando *S. cerevisiae* foi observado que cepas mutadas para o gene *aft1* quando cultivadas em meio depletado de ferro cresciam de forma lenta e exibiam uma baixa captação de ferro, enquanto que em cepas mutadas para o gene *aft2* não houve nenhuma alteração fenotípica. Apesar desses resultados, pouco se conhece sobre os mecanismos e as diferenças funcionais de Aft1 e Aft2.

O zinco é considerado um íon metálico essencial para todos os organismos, por ser requerido como cofator para inúmeras enzimas, como a RNA polimerase sendo importante no mecanismo de transcrição gênica, por prevenir a formação de radicais livres, por participar dos processos de divisão e diferenciação celulares, ser agente funcional para biomembranas e garantir o funcionamento correto de vários tecidos, órgãos e sistemas (Mocchegani & Muzzioli, 2000; Eide, 2003; Vicentefranqueira *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008). Em humanos, foi observado que mais de 3% das proteínas identificadas possuem motivos de ligação a zinco, o que confere importância metabólica a esse metal (Stefanidou *et al.*, 2006; Dainty *et al.*, 2008). O zinco possui ainda um papel crítico em vários tipos de processos bioquímicos, sendo um importante cofator estrutural para inúmeras proteínas, com domínio de dedo de zinco, que se ligam ao DNA (Gaither & Eide, 2001). A aquisição de zinco é reconhecida como chave nos processos infectivos para qualquer patógeno.

Muito do conhecimento a respeito do transporte de zinco e de sua regulação, foi proveniente de estudos com *S. cerevisiae*. Gaither & Eide (2001), citam que estudos com *S. cerevisiae*, demonstraram que o transporte desse íon metálico não é dependente somente da concentração de zinco, mas de fatores, como temperatura e saturação do metal em meio intracelular. Já estudos realizados por Vicentefranqueira *et al.* (2005), focando o mecanismo de captação de zinco em ambientes ácidos e com depleção do íon metálico, observaram que em *A. fumigatus* a captação de zinco é dependente da concentração do íon e pH do meio. MacDiarmid *et al.* (2000), verificaram que aproximadamente $1,5 \times 10^7$ átomos de zinco, são requeridos para o crescimento ótimo de *S. cerevisiae*, sendo que esse valor provavelmente representa o nível ótimo do íon metálico requerido por proteínas zinco-dependentes (Outten *et al.* 2001).

Várias classes de moléculas estão envolvidas no transporte de zinco. Em estudos realizados com bactérias gram-negativas cultivadas sob depleção do íon metálico, foi

observado inicialmente em *Escherichia coli* a presença de genes que codificam um conjunto de proteínas, denominadas transportadores znuABC (*Zn²⁺ uptake systems ABC*), que fazem a captura de íons Zn^{2+} , do meio extracelular. Esse sistema é constituído pelas permeases znuA (*periplasmic binding protein*), znuB (*integral membrane protein*), znuC (*ATP-ase component*), sendo znuA responsável pela captura de zinco para o meio intracelular, znuB uma permease membranar e znuC o componente ATPase utilizado por znuA e znuB (Patzner & Hantke, 1998; Patzner & Hantke, 2000). Berducci *et al.* (2004) e posteriormente Chandra *et al.* (2007), observaram que esse conjunto de proteínas pertencem à família ATP-ase, ou seja dependem de ATP para promoverem a captação de zinco. Em eucariotos foram encontradas duas famílias de transportadores envolvidas no processo de captação de zinco: a família ZIP (*Zrt/Irt like proteins*) que é composta tanto por proteínas Zrt (*zinc-regulated transporter*) presentes inicialmente na levedura *S. cerevisiae*, quanto por proteínas Irt (*iron-regulated transporter*) presentes em *Arabidopsis thaliana*, possivelmente localizadas na membrana plasmática e a família CDF (*cation diffusion facilitator*) que é composta por proteínas possivelmente localizadas na membrana de vacúolos, sendo que nenhuma das duas famílias pertence à classe das ATP-ases, ou seja, nesse caso são gradiente - dependentes.

Zhao & Eide (1996a), estudaram a presença de um sistema de alta afinidade expresso pelos genes *zrt1* e um de baixa afinidade expresso pelo gene *zrt2*, em *S. cerevisiae* homólogo ao sistema presente em *Arabidopsis thaliana* (proteínas Irt). Vicentefranqueira *et al.* (2005), identificaram, em *A. fumigatus*, os genes *zrfA* (*high-affinity zinc transporter*) e *zrfB* (*low-affinity zinc transporter*), que codificam proteínas estruturalmente similares, aos transportadores de alta e baixa afinidade, Zrt1 e Zrt2, respectivamente, em *S. cerevisiae*. Os sistemas de captação de alta e baixa afinidade, entre *S. cerevisiae* e *A. thaliana*, são estreitamente relacionados, afinal possuem uma taxa de 44% e 67% de identidade e similaridade, respectivamente. Através de análises de topologia ainda foi descrito que os

transportadores Zrt1 e Zrt2, de *S. cerevisiae* possuem oito domínios transmembranares assim como a permease transportadora de ferro, Irt, de *A. thaliana*. As características referentes à topologia da permease Zrt1 estão ilustradas na **figura 1** (Gaither & Eide, 2001).

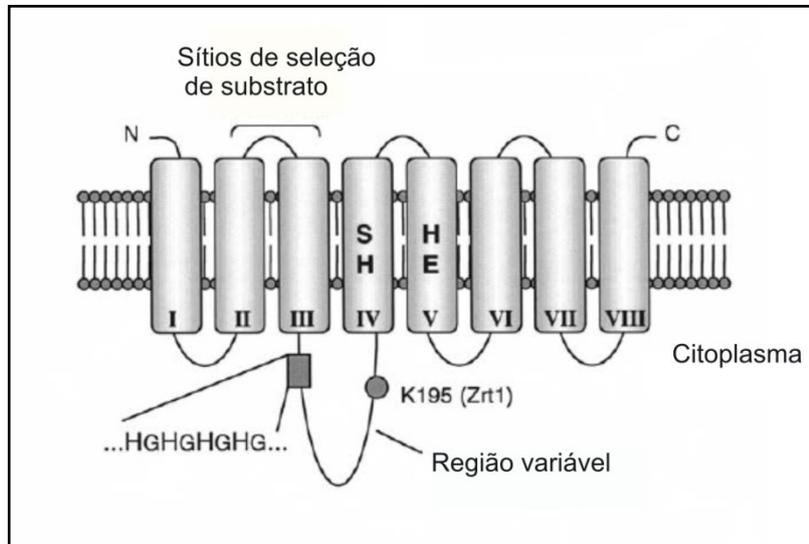


Figura 1: Topologia predita para os transportadores da família Zip. Para os transportadores da família Zip a topologia predita sugere a presença de oito domínios transmembranas (I-VIII). A região variável dessas permeases se encontra nos domínios IV e V, os quais possuem regiões importantes que são conservadas.

A família das proteínas facilitadoras da difusão de cátions (CDF), assim como a família ZIP, está presente em todos os organismos, embora seu mecanismo de transporte ainda não tenha sido examinado detalhadamente. Sabe-se que esses grupos de transportadores promovem o transporte de zinco, do citoplasma para o interior de vacúolos, ou do citoplasma para o lúmen de organelas (Gaither & Eide, 2001).

Em *S. cerevisiae* foram descritos três transportadores potenciais para o zinco, que transportam esse metal do citoplasma para o interior dos vacúolos e do Retículo Endoplasmático, os quais pertencem à família CDF, Zrc1 (*intracellular Zn²⁺ transporter*), Cot1 (*intracellular Zn²⁺/Co²⁺ transporter*) e Msc2 (*endoplasmic reticulum Zn²⁺ transporter*) (Gaither & Eide, 2001), sendo Zrc1 e Cot1 homólogos ao transportador ZnT1 (*human zinc*

transporter 1), presente em humanos. MacDiarmid & Eide (2000), identificaram outro gene, *zrt3*, em *S cerevisiae*, o qual codifica uma permease responsável por transportar íons zinco do interior dos vacúolos, quando há a escassez do metal no meio intracelular. Esse transportador, ao contrário dos demais, pertence à família ZIP, assim como os transportadores de alta e baixa afinidade, e possivelmente são regulados pelo mesmo fator de transcrição, Zap1 (*zinc-responsive transcriptional regulator*).

Uma vez que o zinco é transportado através da membrana plasmática e chega ao meio intracelular, primeiramente esse íon é utilizado para suprir organelas, como o Retículo Endoplasmático e para auxiliar na síntese de metaloproteínas dependentes desse metal. Conklin *et al.* (1994), demonstraram que em leveduras, os átomos excedentes de zinco presentes em meio intracelular, são em sua maioria mobilizados e estocados em vacúolos, sendo essas organelas o principal sítio de estoque de zinco presente nesses microrganismos. Dessa forma, essas estruturas auxiliam nos processos de desintoxicação celular gerada pelo excesso do íon no citoplasma (Simm *et al.*, 2007). Por serem sítios de estoque de zinco, os vacúolos se tornam uma organela de extrema importância na atuação e sobrevivência de fungos patogênicos (Lulloff *et al.*, 2004; Liuzzi *et al.*, 2005). A **figura 2** representa, de forma sucinta, a possível rota metabólica percorrida pelos átomos de zinco, bem como as principais permeases envolvidas nesse mecanismo, em *S. cerevisiae* (Gaither & Eide, 2001; Rutherford & Bird, 2004).

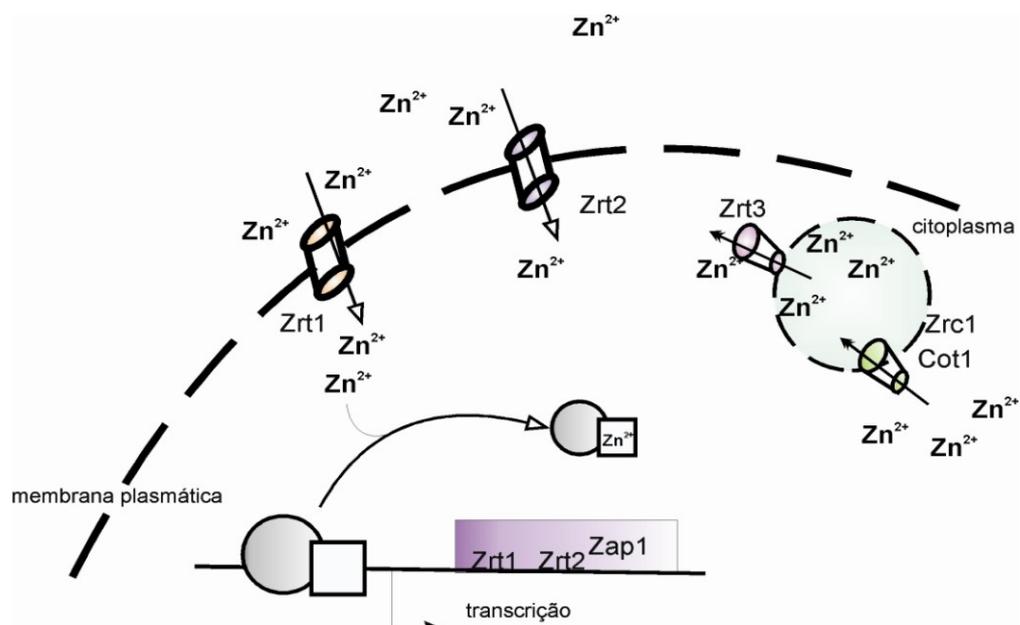


Figura 2: Possível rota metabólica percorrida por átomos de zinco em *S. cerevisiae*. As permeases de alta e baixa afinidade, Zrt1 e Zrt2, respectivamente, provavelmente estão localizadas na membrana plasmática e são envolvidas na captação de íons zinco presentes no meio extracelular. Os transportadores Zrc1, Cot1 e Zrt3 estão localizados na membrana dos vacúolos, exercendo tanto a função de mobilizar o excesso de zinco presente no citoplasma, quanto de transportar íons zinco do interior de vacúolos para o citoplasma, quando os níveis do metal encontram-se limitados. Zap1 é o possível fator de transcrição que provavelmente regula a expressão dos transportadores Zrt1, Zrt2 e Zrt3, de acordo com a concentração de íons zinco disponíveis em meio intracelular.

Até hoje dois fatores de transcrição que controlam a expressão gênica em resposta à deficiência de zinco são bem caracterizados. Esses são: o fator de transcrição zinco-responsivo, Zap1, presente em *S. cerevisiae*, que ativa a expressão gênica dos transportadores de alta e baixa afinidade de zinco mediante a deficiência do metal e o fator de transcrição zinco-responsivo, Mtf-1 (*metal-regulatory transcription factor 1*), em humanos que é ativado por íons zinco. Para ambos os fatores, os ativadores transcricionais possuem mecanismos em comum, dentre eles, domínios de ligação ao DNA ricos em motivos de dedo de zinco, conhecidos por C₂H₂ (Rutherford & Bird, 2004). Lyons *et al.* (2000), através de estudos por microarranjos de DNA, em levedura, sugeriram que o gene *zap1* é responsável por controlar a expressão de mais 42 genes relacionados à homeostase de zinco celular.

As atividades dos transportadores de zinco, pertencentes à família ZIP, em *S. cerevisiae* podem ser reguladas tanto em nível transcricional, quanto pós-transcricional. A nível transcricional, em *S. cerevisiae*, os mecanismos de captação de zinco são regulados em resposta a concentração de zinco intracelular, através do produto gênico gerado por *zap1* que por sua vez se liga a elementos zinco-responsivos (ZREs) presentes nas regiões promotoras dos genes *zrt1*, *zrt2* e *fet4* que codificam respectivamente, os transportadores de alta e de baixa afinidade de zinco e o transportador de baixa afinidade de ferro (Zhao & Eide, 1997; Zhao *et al.*, 1998; Waters & Eide, 2002; Dainty *et al.*, 2008; Sabiha *et al.*, 2009). Vale ressaltar que cada gene envolvido no transporte de alta e de baixa afinidade pode ter mais de um elemento zinco-responsivo (ZRE) em sua respectiva região promotora o que diferencia a resposta em relação à disponibilidade de zinco intracelular entre os genes envolvidos na captação do metal (Gaither & Eide, 2001). Zap1 pode se ligar também a elementos zinco responsivos localizados em sua própria região promotora por um mecanismo de auto-regulação. Assim, a diferença de sensibilidade em relação ao nível de zinco intracelular observada nos genes envolvidos na captação de zinco e do próprio Zap1 pode ser relacionada às funções desempenhadas por cada proteína envolvida nos processos de captação e regulação de zinco. Dessa forma, quando as células entram em períodos nos quais há a escassez de zinco, a primeira resposta celular gerada é o aumento da atividade das permeases de baixa afinidade, Zrt2 e Fet4. Se a escassez de zinco ficar mais severa então é induzida a expressão do transportador de alta afinidade, Zrt1. Então a expressão de Zap1 é induzida para que haja a regulação dos mecanismos de captação de zinco.

Ainda não é bem entendido como íons zinco regulam o fator Zap1. Bird *et al.* (2000), observaram *in vivo* dois domínios de ativação, com regiões dedo de zinco, presentes na proteína Zap1: ADI e ADII, que possivelmente estão ligados a esse processo de regulação. Já Gaither & Eide (2001), sugeriram que o produto do gene *zap1* é um sensor direto de zinco que

possui em sua topologia um ou mais sítios de regulação de baixa afinidade para o metal que se ligam ao domínio de ligação do DNA, em adição a dedos de zinco C_2H_2 de alta afinidade. Dessa forma, a ligação de zinco nesses sítios regulatórios pode estabilizar a conformação da interface de ligação ao DNA proporcionando a regulação de Zap1.

Já a nível pós-traducional, quando há o aumento da concentração extracelular de zinco, Zrt1, perde rapidamente sua função através do processo de endocitose seguida de degradação protéica intra-vacuolar (VanHo *et al.*, 2002). Gitan *et al.*, (1998), observaram que para células mutadas para o gene *zap1*, o processo de regulação pós-traducional continuava a acontecer, o que torna ambos os processos de regulação independentes, apesar de que esses processos devem acontecer de forma harmônica para que haja a manutenção de homeostasia celular. Gaither & Eide (2001), verificaram que o aumento extracelular de Co^{2+} e de Cd^{2+} podem também induzir o processo de endocitose da permease Zrt1, o que pode ser explicado pelo fato de ambos os metais possuírem características químicas que se assemelham ao Zn^{2+} . Assim, esses íons se ligam aos sítios de ligação da mesma maneira que o zinco mimetizando a cascata de sinal para o processo de ubiquitinação do transportador de alta afinidade de zinco.

Em *Candida albicans* estudos realizados por Kim *et al.* (2008), demonstraram a existência do fator de transcrição zinco-responsivo, Crs1 (*Candida* *Supressor of ROK1/ zinc-responsive transcription factor*), que é codificado por um gene homólogo ao gene *zap1* em *S. cerevisiae*, que regula a expressão dos genes *zrt1* e *zrt2*, sendo de extrema importância para o crescimento filamentosos e patogenicidade do fungo. Moreno *et al.* (2007), discutiram o papel do gene *zfaA* (*zinc-responsive transcriptional activator*), que possivelmente codifica um fator de transcrição para proteínas zinco-responsivas, homólogo ao gene *zap1* de *S. cerevisiae*, na regulação da homeostase de zinco e aumento da virulência, em *A. fumigatus*, ao observarem que cepas mutadas do fungo para o gene *zfaA* quando inoculadas em modelos murinos não eram capazes de estabelecer um processo infeccioso. Dainty *et al.* (2008), ao avaliarem os

níveis de mRNA, de cepas mutadas para o gene *zap1*, em *Schizosaccharomyces pombe* cultivados sob condições limitantes de zinco, observaram que apenas 2,5% dos genes identificados por microarranjo são regulados em condições de deficiência de zinco, dentre eles estão, *zrt1*, *zrt2* e *zap1*.

Para melhor entender a resposta de fungos a condições de depleção de metais, como zinco e ferro, estudos tem sido conduzidos não só com o intuito de elucidar o comportamento desses microrganismos em ambientes onde há a escassez ou excesso desses metais, mas de avaliar uma resposta global de como esses microrganismos se comportam *in vivo*, já que a homeostase de íons metálicos parece funcionar em rede. Estudos como o de Sabiha *et al.* (2009), que observaram o comportamento de *A. fumigatus* em camundongos infectados, em relação à disponibilidade de ferro e zinco, tanto em meio extracelular, quanto em meio intracelular, tornam-se essenciais para que novos estudos acerca dos mecanismos de homeostase de metais sejam desenvolvidos em fungos.

I.4 Transportadores de zinco de alta e baixa afinidade (Zrt1/Zrt2) em *P. brasiliensis*.

A avaliação dos perfis de expressão gênica de microrganismos patogênicos tem sido amplamente estudada com o objetivo de compreender as estratégias de adaptação, sobrevivência e virulência que estes microrganismos utilizam durante o processo infeccioso. Com o propósito de identificar genes potencialmente envolvidos na adaptação e sobrevivência de *P. brasiliensis* no hospedeiro durante a infecção, Bailão *et al.* (2006), utilizaram a Análise de Diferença Representacional de cDNA (cDNA-RDA) para identificar genes de *P. brasiliensis* induzidos durante o processo infectivo e em condições que mimetizam a via hematológica de disseminação fúngica. No modelo de infecção experimental foi observada

alta frequência dos transcritos homólogos à *zrt1* e *zrt2*, que codificam os transportadores de alta e baixa afinidade de ferro e zinco, respectivamente. Bailão *et al.* (2007), ao continuarem os estudos de avaliação do perfil transcricional, através da técnica de Análise de Diferença Representacional de cDNA (cDNA-RDA) do fungo *P. brasiliensis*, utilizando dessa vez, células do fungo incubadas com plasma humano por 10 e 60 min., novamente observaram a presença dos genes que codificam os transportadores de alta e baixa afinidade de ferro e zinco.

A alta frequência dos transcritos homólogos aos genes *zrt1* e *zrt2* em *P. brasiliensis*, em condições que mimetizam o comportamento do fungo durante o processo infectivo, levou o nosso grupo a iniciar estudos sobre esses transportadores e de outros genes envolvidos na homeostase de zinco em *P. brasiliensis*. Análises comparativas de seqüências de DNA, usando o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990), demonstraram homologia entre seqüências de genes envolvidos tanto na captação do metal, quanto na homeostase do mesmo, entre *P. brasiliensis* e outros fungos patogênicos, como *C. albicans* e *A. fumigatus* e na levedura *S. cerevisiae*. Diante dessas análises, nosso interesse é estudar o padrão de expressão dos transportadores de alta e baixa afinidade de ferro e zinco e dos possíveis genes envolvidos na homeostase de zinco durante condições de cultivo do fungo *P. brasiliensis* utilizando diferentes concentrações dos metais zinco ferro e cobre.

II – Justificativa

Sabe-se que micronutrientes, como zinco, ferro e cobre são essenciais para o metabolismo de organismos, por participarem de processos bioquímicos vitais. Dessa forma, condições, como a baixa proporção de íons metálicos disponíveis em tecidos do hospedeiro, garantem uma das principais defesas do mesmo contra vários patógenos.

Investigações, através de ferramentas de bioinformática, de possíveis genes envolvidos na homeostase de metais, em conjunto com estudos realizados com cepas mutadas de *S. cerevisiae* para os possíveis genes ligados à captura de metais, contribuíram para o início dos estudos sobre os possíveis mecanismos de captação de metal existentes em microrganismos patogênicos, em meios que mimetizam tecidos do hospedeiro. Estudos recentes evidenciam que os mecanismos ligados à captação e à homeostase de metais estão fortemente ligados entre si e são por sua vez um importante fator de virulência para patógenos. Ressalta-se ainda a ligação entre a homeostase de metais e o sistema imune de humanos e outros animais.

Estudos prévios em nosso laboratório, através da técnica de Análise de Diferença Representacional de cDNA (cDNA-RDA), utilizando o fungo patogênico *P. brasiliensis*, revelaram transportadores de alta e baixa afinidade de zinco (*PbZrt1/PbZrt2*), como moléculas altamente expressas em condições que mimetizam o processo infeccioso. Essas análises tornaram-se o ponto de partida para o início dos estudos de genes envolvidos na homeostase de micronutrientes nesse patógeno.

III – Objetivos

Em função do exposto, foi proposto no presente trabalho a caracterização dos transportadores de alta e baixa afinidade de zinco (*PbZrt1/PbZrt2*) e de genes relacionados à manutenção da homeostase de zinco em *P. brasiliensis*. As metas experimentais foram:

- Rastreamento e identificação *in silico* de genes relacionados à manutenção da homeostase de zinco em *P. brasiliensis*, no banco de dados do genoma estrutural de *P. brasiliensis* (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html).
- Análises por PCR em tempo real do perfil de expressão dos genes envolvidos no metabolismo de zinco em *P. brasiliensis*, em condições de restrição de zinco, ferro e cobre;
- Análises por PCR em tempo real do perfil de expressão dos genes envolvidos no metabolismo de zinco, a partir de RNAs extraídos de células leveduriformes de *P. brasiliensis* derivadas de órgãos de animais infectados.

IV- Materiais e Métodos

IV.1-Fluxograma

O fluxograma dos experimentos realizados no trabalho é apresentado na **figura 3**.

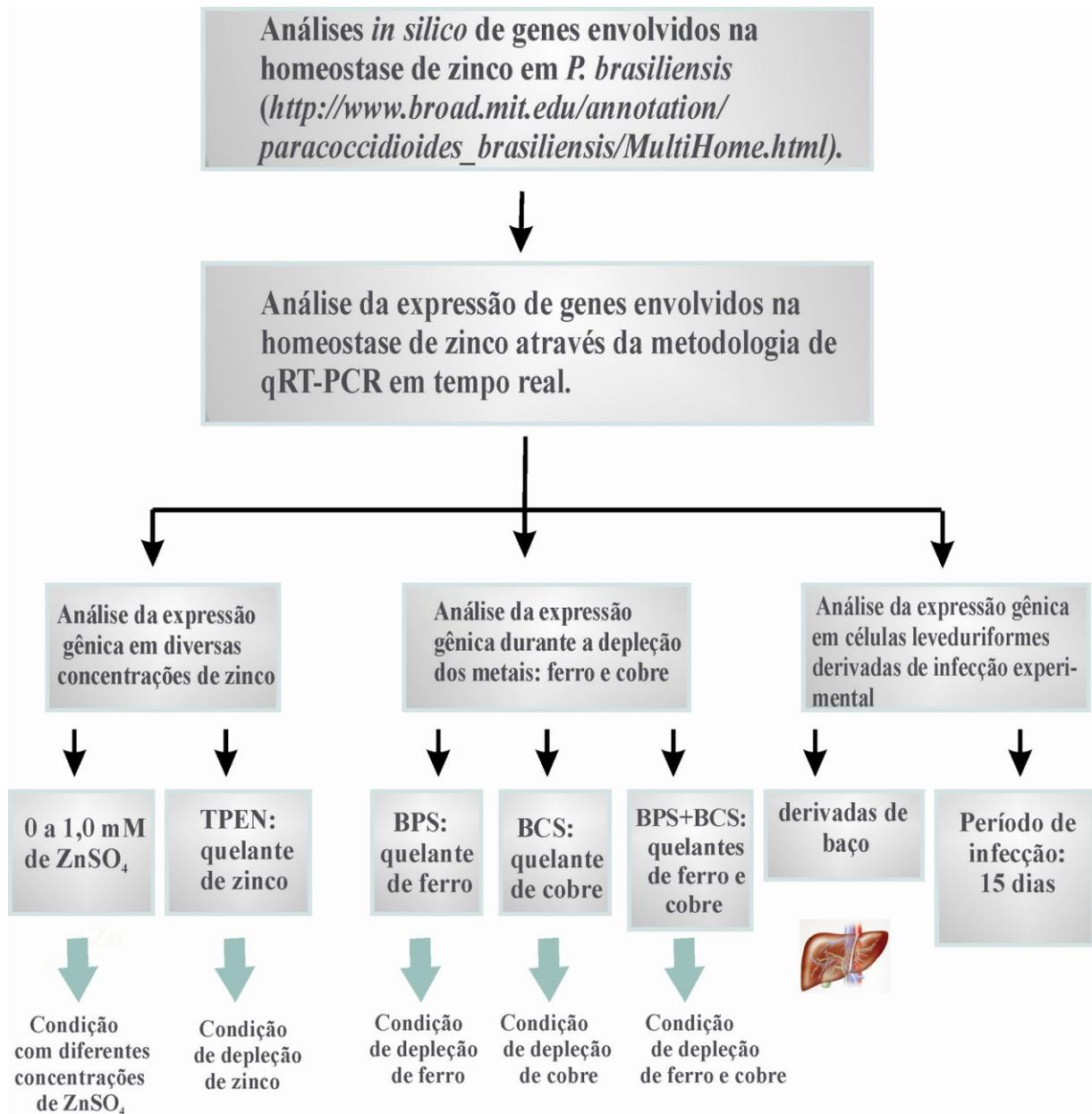


Figura 3: Fluxograma representativo das metas experimentais realizadas neste trabalho.

IV. 2 – Microrganismo e condições de crescimento.

Foi utilizado o isolado 01 (coleção ATCCMYA-826) de *P. brasiliensis*, já caracterizado e padronizado em nosso laboratório. Células leveduriformes do fungo foram cultivadas e mantidas em meio de cultura Fava-Netto por 7 dias (Fava-Netto, 1955) a 36°C.

IV. 3 – Rastreamento e identificação *in silico* de genes relacionados à manutenção da homeostase de zinco em *P. brasiliensis*.

O rastreamento e a identificação dos genes envolvidos no metabolismo de zinco foram realizados no banco de dados do Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.htm) no qual está depositado o genoma estrutural de três isolados do fungo *P. brasiliensis* (01, 03 e 18). Inicialmente, seqüências de genes descritos como envolvidos na manutenção da homeostase de zinco em *S. cerevisiae*, foram obtidas no banco de dados do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) (Altschul *et al.*, 1990) e comparadas com o banco de dados do genoma estrutural, para a obtenção de genes homólogos nos três isolados de *P. brasiliensis*. As seqüências identificadas foram utilizadas para elaboração de um modelo presumivelmente utilizado pelo fungo na manutenção da homeostase de zinco.

IV. 4 – Análises de Bioinformática.

As análises de identidade e similaridade entre as possíveis sequências de aminoácidos derivados de genes envolvidos na homeostase de zinco foram realizadas a partir de sequências depositadas no tanto no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), quanto no banco de dados do genoma estrutural de *P. brasiliensis* (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.htm) através do programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Em seguida, o alinhamento entre as sequências homólogas foi gerado pelo programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997).

IV. 5 – Cultivo de células leveduriformes de *P. brasiliensis* em diferentes concentrações de sulfato de zinco.

Para os experimentos utilizando diferentes concentrações de zinco, 2×10^8 células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram removidas de meio sólido Fava-Neto (Fava Neto, 1955) e transferidas para meio líquido Fava-Neto, no qual foram mantidas durante 72 h a 37 °C sob agitação, a 200 rpm. Após o período de incubação, a cultura foi centrifugada a 12.000 g por 10 min e as células foram lavadas em tampão fosfato (PBS 1 X) estéril (**Tabela 1**). As células foram ressuspensas em 5 mL de meio de cultura McVeigh & Morton (MMcM) – Modificado (Restrepo & Jiminez, 1980) (**Tabelas: 2, 3 e 4**). Um inóculo de 2×10^6 células foi introduzido em meio MMcM e a cultura foi incubada por 16 h a 37 °C sob agitação de 200 rpm. As células então foram transferidas para meio MMcM, adaptado para as seguintes concentrações finais de ZnSO_4 : 2,75 μM , 10 μM e 1,0 mM (**Figura 4**). Para a condição controle as células foram crescidas em meio MMcM sem adição de ZnSO_4 . As células foram

então incubadas por 1 h sob agitação de 200 rpm a 37 °C. Para a execução desse experimento o meio MMcM foi preparado com água MilliQ em vidrarias tratadas com 5 N de HCl durante 20 min, para garantir a ausência de íons zinco das mesmas.

Tabela 1 – Tampão Fosfato 10 X*

Fosfato de Sódio Monobásico (Na ₂ PO ₄) (10mM)	1,189 g
Fosfato de Potássio Monobásico (KH ₂ PO ₄) (2mM)	0,2 g
Cloreto de Sódio (NaCl) (137mM)	8 g
Cloreto de Potássio (KCl) (2,7mM)	0,15 g
Água desstilada q.s.p.	1mL

*O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH. O tampão foi autoclavado a 120 °C por 20 min.

Tabela 2 – Meio Mínimo Mc Veigh & Morton (MMcM)*

Glicose	10g
Fosfato de Potássio Monobásico (KH ₂ PO ₄)	1,5 g
Sulfato de Magnésio Hepta-hidratado (MgSO ₄ . 7H ₂ O)	0,5 g
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂ . 2 H ₂ O)	0,15 g
Sulfato de Amônia (NH ₄ SO ₄)	2,0 g
L-asparagina	.2,0 g
L-cistina	0,2 g
Solução de vitaminas #	10 mL

Solução de elementos traços	1mL
Água bidestilada q.s.p.	1000mL

* O Meio é apropriado para cultura de *P.brasiliensis* na fase leveduriforme, facilitando estudos das características antigênicas, fisiológicas e metabólicas desse microrganismo (Restrepo & Jiminez, 1980). Todos os componentes foram misturados, exceto a solução de vitaminas. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH. O meio foi autoclavado a 120 °C por 20 min. Após, o resfriamento do mesmo, foram adicionados a solução de vitaminas e os antibióticos penicilina (120.000 U.I/mL) e cloranfenicol (100 mg/mL). A cistina foi dissolvida, por aquecimento, em volumes de água, onde gotas de NaOH 1 M foram adicionadas até completa dissolução e logo após adicionada ao meio de cultura.

Tabela 3 - Solução de Vitaminas

Tiamina	6,0 mg
Niacina	6,0mg
Pantotenato de Ca	6,0mg
Inositol	1,0 mg
Biotina	0,1 mg
Riboflavina	1,0 mg
Ácido Fólico	10 mg
Cloreto de colina	10 mg
Piridoxina	10 mg
Água bidestilada q.s.p.	100 mL

Tabela 4- Solução de Elementos Traços

Ácido Bórico (H_3BO_3)	5,7 mg
Sulfato de Cobre Penta-hidratado ($CuSO_4 \cdot H_2O$)	15,7 mg
Sulfato Ferroso Amoniacal Hexa-hidratado ($Fé(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$)	140,4 mg
Sulfato de Manganês $MnSO_4 \cdot 14H_2O$	8,1 mg
Molibdato de amônio ($(NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$)	3,6 mg
Sulfato de Zinco ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	79,2 mg
Água bidestilada q.s.p.	100 mL

Sulfato de zinco foi adicionado somente nos meios que contém BCS e BPS. Sulfato de cobre foi adicionado somente nos meios que não contém BCS e o componente sulfato ferroso foi adicionado somente nos meios que não contém BPS.



Figura 4: Condições de cultivo de *P. brasiliensis* em diferentes concentrações de zinco (ZnSO₄).

Após incubação em meio com diferentes concentrações de ZnSO₄, as células foram coletadas por centrifugação. Os precipitados formados foram lavados em MMcM para posterior extração de RNA. O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol, seguindo os procedimentos indicados pelo fabricante (InvitrogenTM, Life Technologies, Carlsbad, CA).

IV. 6 – Experimentos de depleção de zinco em *P. brasiliensis*.

Para os experimentos de depleção de zinco intra e extracelular, 2×10^8 células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram removidas de meio sólido Fava-Neto (Fava Neto, 1955), e transferidas para meio líquido Fava-Neto, no qual foram mantidas durante 72 h a 37 °C sob agitação de 200 rpm. Após o período de incubação, a cultura foi centrifugada a 12.000 g por 10 min, as células foram lavadas em tampão PBS estéril 1 X e em seguida foram ressuspensas em 5 mL de meio de cultura MMcM. Um inóculo de 2×10^6 células foi introduzido em meio MMcM, complementado com quelante zinco-específico TPEN [*N,N,N,N*- tetrakis (2-pyridyl-methyl)ethylenediamine] (Sigma-Aldrich), nas seguintes concentrações finais: 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1,0 mM e 2,0 mM. As culturas foram crescidas durante 24 h sob agitação de 200 rpm a 37 °C (**Figura 5**). A condição controle continha células leveduriformes de *P. brasiliensis* cultivadas em meio mínimo MMcM sem a presença de agentes quelantes de metais. Para que fossem realizadas análises de viabilidade celular, com a finalidade de padronizar as variáveis concentração e tempo de incubação na presença do quelante que não fossem letais às células leveduriformes, foram retiradas alíquotas a vários tempos na presença do quelante de zinco. As células coletadas foram diluídas na proporção de 1:10 em corante Trypan Blue 0,4%, para avaliação da viabilidade celular em câmara de Neubauer. Mediante as análises obtidas, o procedimento de incubação foi realizado para a obtenção do RNA total. Após a incubação em meio depletado de zinco, as células foram centrifugadas a 12.000 g por 10 min. Os precipitados formados foram lavados com tampão PBS 1 X estéril para posterior extração de RNA. O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol, seguindo os procedimentos indicados pelo fabricante (Invitrogen™).

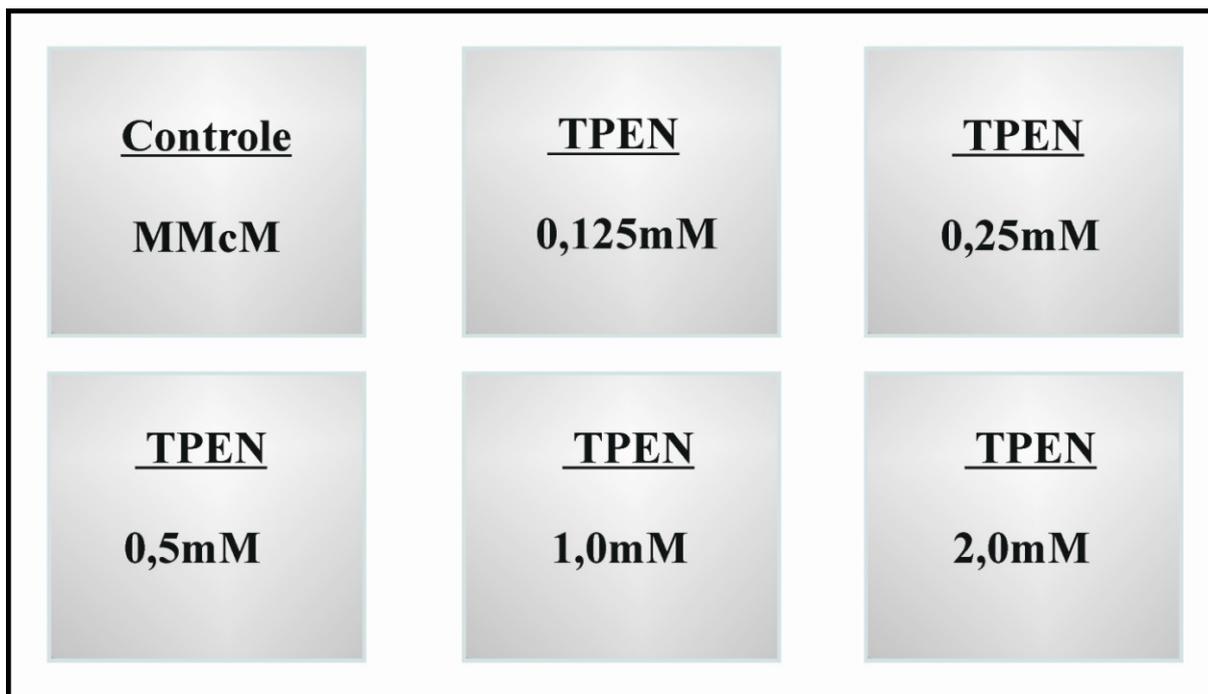


Figura 5: Condições de cultivo de *P. brasiliensis* durante privação de zinco.

IV. 7 – Experimentos de depleção de ferro e/ou cobre em *P.brasiliensis*.

Para os experimentos de depleção de ferro e cobre, 2×10^8 células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram removidas de meio sólido Fava-Neto (Fava Neto, 1955), e transferidas para meio líquido Fava-Neto, no qual foram mantidas durante 72 h a 37 °C sob agitação de 200 rpm. Após o período de incubação, a cultura foi centrifugada a 12.000 g, as células foram lavadas em tampão PBS estéril 1 X e em seguida foram ressuspensas em 5 mL de meio de cultura MMcM. Um inóculo de 2×10^6 células foi introduzido em meio MMcM, adaptado para as condições de restrição de ferro e cobre (**Figura 6**). A condição controle continha células leveduriformes de *P.brasiliensis* cultivadas em meio mínimo MMcM sem a presença de agentes quelantes de metais. A condição de privação de ferro continha células leveduriformes em meio mínimo MMcM na presença de um agente quelante específico de ferro (**BPS**:

batofenantrolinadisulfonato sódico; 50 μM). A condição de privação de cobre continha células leveduriformes em meio mínimo MMcM na presença de um agente quelante específico de cobre (**BCS**: batocuproinadisulfonato sódico; 50 μM). A condição de depleção de cobre e ferro continha células leveduriformes em meio mínimo MMcM na presença dos dois agentes quelantes **BCS** e **BPS** (50 μM). As células leveduriformes foram crescidas por um período de 3h sob agitação de 200 rpm à temperatura de 37 °C. Após a incubação em meio com privação dos micronutrientes ferro ou cobre, as células foram coletadas por centrifugação. Os precipitados foram lavados com PBS 1 X estéril para extração de RNA. O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol, seguindo os procedimentos indicados pelo fabricante (Invitrogen™).

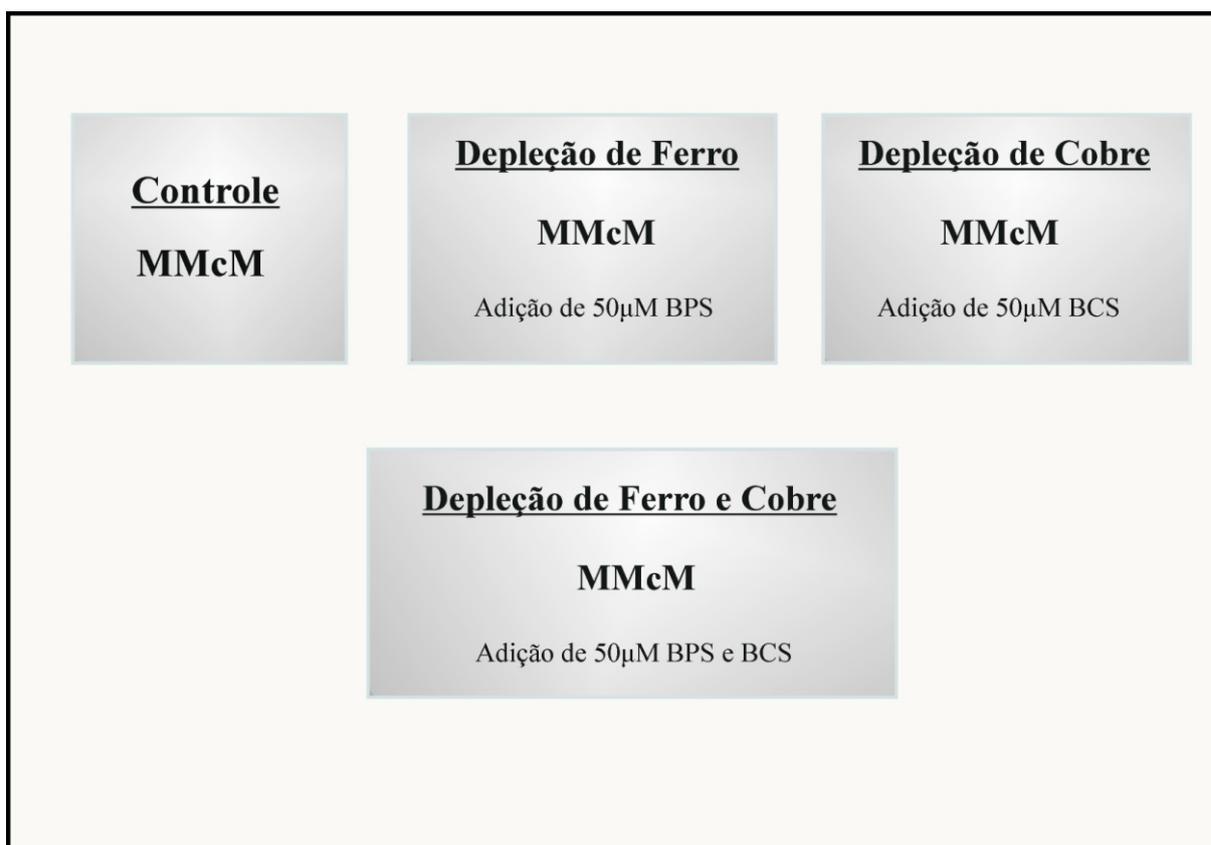


Figura 6: Condições de cultivo de *P. brasiliensis* durante a privação de ferro e cobre.

IV. 8 – Infecção Experimental.

Seis fêmeas de camundongos isogênicos da linhagem BALB/c foram infectadas por via intraperitoneal com 5×10^6 células *P. brasiliensis* na forma de levedura e foram sacrificadas 15 dias após a infecção. O baço dos animais infectados por via intraperitoneal, foram removidos e homogeneizados em 5 mL de PBS 1 X. Aliquotas de 100 µl do material homogeneizado foram plaqueadas em meio BHI Ágar (Acumedia®), suplementado com 4% de soro fetal bovino (Invitrogen™) e 1% de glicose (Vetec). Devido ao fato de as células leveduriformes de *P. brasiliensis* derivadas de órgãos de animais infectados demorarem no mínimo 10 dias para crescerem em meio de cultura, após 14 dias de crescimento a 37 °C as células foram utilizadas para extração de RNA.

IV. 9 – Extração de RNA (Trizol®).

Todos os procedimentos envolvendo manipulação de células foram realizados em condições livres de RNAses. Por essa razão, todos os materiais e soluções utilizados receberam tratamentos especiais. As vidrarias foram embaladas em papel alumínio, autoclavadas e tratadas em estufa a 180 °C por um período de 4 h. Os materiais plásticos utilizados eram novos e tratados com água DEPC 0,1%, durante 2 h. As cubas de eletroforese foram tratadas com peróxido de hidrogênio 3 %, durante 4 h. As soluções foram feitas com água previamente tratada com DEPC 0,1 %.

Para a extração de RNA de *P. brasiliensis* foi utilizado o método Trizol (GIBCO™ Invitrogen Corporation), seguindo o protocolo do fabricante. Células leveduriformes de *P.*

brasiliensis nas diferentes condições experimentais foram, após centrifugação, pesadas e em seguida foi acrescido trizol na proporção de 3,5 mL para 1,5 mL de células. Foi então adicionado o mesmo volume de pérolas de vidro livres de RNAses. O material foi agitado em vórtex por 10 min, mantido em repouso por 10 min à temperatura ambiente e centrifugado a 12.000 g por 10 min a 4 °C. Com o auxílio de uma pipeta, a fase superior foi transferida para um tubo novo. A essa fase foi adicionado clorofórmio (200 µL para cada 0,75 mL de trizol). O material foi homogeneizado por 5 min. em vórtex, incubado durante 10 min à temperatura ambiente e centrifugado a 12.000 g por 15 min a 4 °C. A fase aquosa foi recolhida, sendo adicionado à mesma, uma mistura de clorofórmio: fenol: álcool isoamílico (v/v). O material foi agitado, incubado durante 10 min à temperatura ambiente e centrifugado a 12.000 g por 15 min a 4 °C. A fase aquosa foi recolhida e o RNA nela contido foi precipitado pela adição da solução contendo citrato de sódio 1,2 M, cloreto de sódio 0,8 M e isopropanol (0,25 ml para cada 0,75 mL de trizol). O material foi agitado, incubado à temperatura ambiente por 10 min e centrifugado a 12.000 g por 30 min a 4 °C. O sedimento obtido foi lavado com etanol 75 % (1 mL para cada 0,75 mL de trizol), e centrifugado a 12.000 g por 5 min a 4 °C. O RNA resultante foi seco à temperatura ambiente por 10 min e ressuspendido em água tratada com DEPC 0,1 %. O RNA foi quantificado por espectrofotometria, aliquoteado e estocado a -80 °C.

IV. 10 – Síntese de cDNA.

Após a extração do RNA total, foi realizada a reação de síntese da primeira fita de cDNA. Primeiramente, foram adicionados a um tubo tipo eppendorf 0.6 mL (Axygen®), 4µL de RNA total (concentração final 1 µg), 2 µL de dNTPs (10 mM cada: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen™), 2 µL de oligonucleotídeo oligo(dT)₁₅ e 12 µL de água milliQ. A mistura foi incubada a 65 °C por 5 min, em um termociclador. Em seguida, foram adicionados ao mesmo eppendorf, 4 µL de tampão de primeira fita 5X (250 ηmol Tris-HCl pH 8.3, 375 ηmol KCl, 15 ηmol MgCl₂), 0,5 µL de RNase out, 2 µL de 10 mM DTT (ditiotretitol), 1 µL da enzima transcriptase reversa SuperScript II (kit Invitrogen™) e água milliQ para um volume final de 100 µL. A reação foi submetida a uma incubação de 42 °C por 1h30min.

IV. 11 – Análise da expressão gênica por RT- PCR quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR).

Os cDNAs foram utilizados em reações de qRT-PCR que foram realizadas utilizando-se a mistura SYBR green (Applied Biosystems, Foster City, CA) no sistema StepOnePlus™ real time PCR (Applied Biosystems.). As reações foram realizadas em triplicatas. A especificidade de cada par de oligonucleotídeos utilizados foi confirmada pela visualização de um único produto de PCR em gel de agarose 1,2 %. Os oligonucleotídeos com as seqüências correspondentes estão descritos na **tabela 5**. A reação de PCR em tempo real foi realizada em 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. A mistura SYBER Green PCR foi utilizada adicionada de 10 pmol de cada oligonucleotídeo e 40 ng de cDNA molde, em um volume final de 25 µl. As curvas padrões foram geradas para se confirmar um único produto de PCR e foi realizada utilizando-se uma alíquota de cDNA de cada amostra, serialmente

diluídas (1:5 da diluição original). Os dados foram normalizados com o transcrito codificante para a proteína ribossomal L34 amplificado em cada conjunto de experimentos de qRT-PCR. Os níveis de expressão relativa dos genes de interesse foram calculados utilizando-se o método de curva padrão para quantificação relativa (Bookout *et al.*, 2006). Os resultados foram validados pelo teste *t* de Student, sendo consideradas diferenças significativas as amostras que apresentaram $p \leq 0,05$.

Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados para análise da expressão gênica por qRT-PCR em tempo real

<i>Oligonucleotídeos</i>	<i>Seqüência</i>	<i>*TM °C</i>
S- <i>zrt1</i> (sense)	5'- CTA.TCC.GCT.GTG.TTC.GTC.AT – 3'	62°C
AT- <i>zrt1</i> (anti-sense)	5'- GGA.GAT.GGA.TGA.AAG.CTG.TG – 3'	60°C
S- <i>zrt2</i> (sense)	5'- GCA.AAA.TCC.CCC.AAT.GGT.AGT – 3'	62°C
AT- <i>zrt2</i> (anti-sense)	5'- GGG.TAA.GGC.CGA.TTA.TGA.TAG – 3'	62°C
S- <i>c₂h₂</i> (sense)	5'- AAA.TGG.CCG.AAA.AGA.ACT.CCC – 3'	62°C
AT- <i>c₂h₂</i> (anti-sense)	5'- GTT.CTG.ACA.GTC.ATT.CGA.CAG – 3'	62°C
S- <i>ccch</i> (sense)	5'- GAT.TGG.ACA.ACT.TGC.TGG.GC – 3'	62°C
AT- <i>ccch</i> (anti-sense)	5'- CTA.TCC.GCT.GTG.TTC.GTC.AT – 3'	62°C
S- <i>ca</i> (sense)	5'- GTG.TCT.ACT.CCT.TCC.ACG.GT – 3'	60°C
AT- <i>ca</i> (anti-sense)	5'- CTC.TGT.TGC.TGT.AGT.CCA.CG – 3'	62°C
S- <i>gata</i> (sense)	5'- GGC.CAA.AGC.GGA.AAC.CAA.AT – 3'	60°C
AT- <i>gata</i> (anti-sense)	5'- AGT.TTG.GTG.TAT.TGG.TGC.GG – 3'	60°C

* TM: Temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos.

zrt1: Transportador de ferro e zinco de alta afinidade.

zrt2: Transportador de ferro e zinco de baixa afinidade.

c₂h₂: Ativador transcricional de *zrt1* e *zrt2*.

ccch: Transportador de cátion divalente.

calcium (ca): Transportador de cálcio em zinco sarcoplasmático/Retículo Endoplasmático.

gata: Proteína zinco dependente.

V- Resultados

V. 1 – Rastreamento e identificação *in silico* de genes relacionados à manutenção da homeostase de zinco em *P. brasiliensis*.

Baseando-se em estudos prévios acerca dos possíveis mecanismos de homeostasia de zinco observados na levedura *S. cerevisiae*, sequências gênicas referentes a esses estudos foram identificadas, através do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e em seguida foram comparadas, utilizando-se o programa BLAST com o banco de dados do genoma estrutural de *P. brasiliensis* (isolado *Pb01*) (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html). Ao fim do rastreamento foram obtidas oito sequências codificantes para proteínas que possivelmente estão envolvidas na homeostase de zinco no fungo *P. brasiliensis*. As sequências identificadas são referentes às seguintes proteínas: Transportadores de alta e de baixa afinidade de ferro e zinco (*PbZrt1* e *PbZrt2*, respectivamente), o fator de transcrição zinco dependente *PbC₂h₂*, o Transportador de cátion divalente (*PbCcch*/provavelmente presente no Retículo Endoplasmático Rugoso), o Transportador de Cálcio e Zinco (*PbCalcium (Ca)* / provavelmente presente no Retículo Endoplasmático Rugoso), a Proteína Zinco-dependente (*PbGata*) e os Transportadores de zinco intra-vacuolares *PbCot* e *PbCdf*. Com a identificação das sequências citadas foi possível propor uma via de homeostasia de zinco para o fungo *P. brasiliensis*, a qual está ilustrada na **Figura 7**.

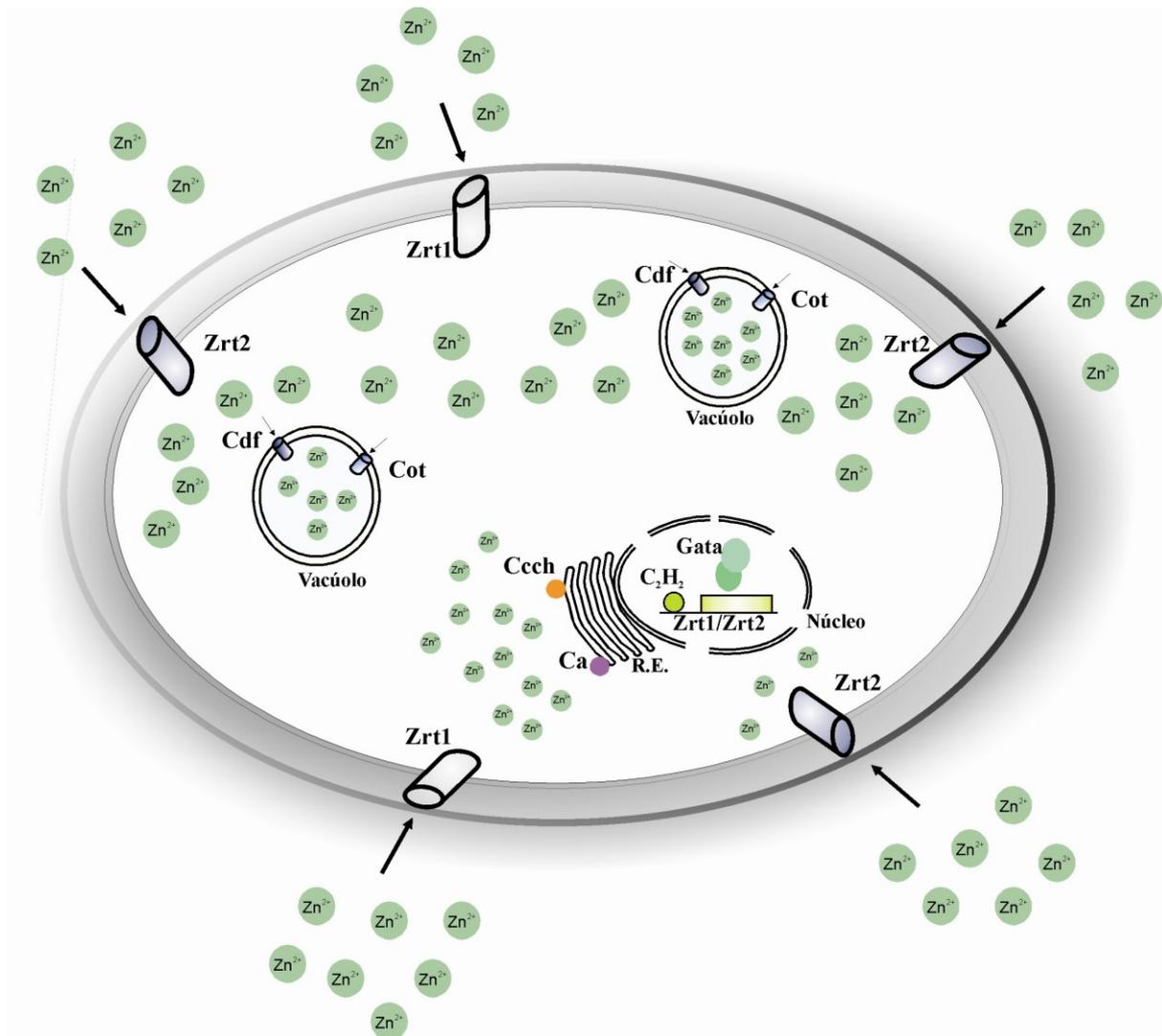


Figura 7: Possível via de homeostase de zinco utilizada pelo fungo *P. brasiliensis*. Os íons zinco são capturados pelos transportadores de alta e baixa afinidade (*PbZrt1* e *PbZrt2*), alcançando o meio intracelular, aonde poderão ser mobilizados, e em seguida transportados através dos transportadores intravacuolares *PbCot1* e *PbCdf* e assim estocados em vacúolos. Os íons zinco podem ainda ser transportados através das proteínas *PbCech* e/ou *PbCa* alcançando o interior do Reticulo Endoplasmático Rugoso, onde por sua vez serão utilizados tanto como componentes estruturais para várias proteínas, quanto no processo de homeostasia de cálcio. A expressão de *PbZrt1* e *PbZrt2* é regulada durante a deficiência de metal, através do fator de transcrição *PbC₂H₂*.

V. 2 – Análises de identidade e similaridade das sequências deduzidas de *PbZrt1* e *PbZrt2* em três isolados de *P. brasiliensis*.

De acordo com as sequências de aminoácidos referentes à *PbZrt1* e *PbZrt2* foi possível fazer comparações de identidade e similaridade entre as sequências gênicas nos três isolados, as quais estão depositadas no banco de dados do genoma estrutural de *P. brasiliensis* (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html). Foi gerado um alinhamento através do programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997). As análises realizadas das sequências deduzidas de aminoácido revelaram que *Zrt1* em *Pb01* apresenta 93% de identidade e 96% de similaridade com *Ztr1* tanto em *Pb03*, quanto em *Pb18*. Análises comparando ainda a sequência deduzida de aminoácidos para *Zrt1* dos isolados *Pb03* e *Pb18* demonstraram 98% de identidade e 99% de similaridade entre esse transportador. Para *Zrt2* em *Pb01* foi observado 92% de identidade e 94% de similaridade com *Ztr2* em *Pb03* e 94% de identidade e 96% de similaridade com *Zrt2* em *Pb18*. Análises comparativas de *Ztr2* em *Pb03* e *Pb18* revelaram 97% tanto de identidade quanto de similaridade entre esses transportadores. Foram observados ainda sítios ricos em histidina e sítios de *N*-glicosilação nas sequências deduzidas de aminoácidos de *Zrt1* e sítios de *N*-glicosilação nas sequências deduzidas de aminoácidos de *Zrt2* nos três isolados de *P. brasiliensis*, através do programa Prosite/Expasy (<http://www.expasy.org/prosite>) (Hofmann *et al.*, 1999) (**Figuras 8 e 9**). Através do programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997), também foram comparadas as sequências deduzidas de aminoácidos, referentes ao fator de transcrição zinco-dependente, ao transportador de cátion divalente, ao transportador de cálcio e zinco e a proteína zinco-dependente do fungo *P. brasiliensis* em relação à levedura *S. cerevisiae* (**Tabela 6**).



Figura 8: Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos de Zrt1 do isolado Pb01, com proteínas homólogas em *P. brasiliensis*. As sequências correspondentes a Zrt1 são: isolado 01 de *P. brasiliensis* (número de acesso no GenBank DS 572854; número de acesso no banco de dados do genoma estrutural de *P. brasiliensis* PAAG_08727.1); isolado 03 de *P. brasiliensis* (número de acesso no banco de dados do genoma estrutural de *P. brasiliensis* PABG_07725.1); isolado 18 de *P. brasiliensis* (número de acesso no banco de dados do genoma estrutural de *P. brasiliensis* PADG_08567.1). Posições de identidade completa são indicadas com asterisco (*), dois pontos (:) indicam substituições conservadas e um ponto (.) indica uma substituição semi-conservada. O primeiro e o último aminoácido de cada sequência estão em negrito. O sítio de *N*-glicosilação está marcado com preenchimento em cinza e o sítio rico em histidina está marcado com preenchimento em amarelo, no qual os resíduos conservados de histidina estão indicados por setas.

```

Pb01      MRPLQVLPAAII SVENLCLLSGGRLGFPIGALSASTASIHLLSKFSYAPLEPQSPLMPG 60
Pb03      -----
Pb18      -----

Pb01      QEPSKICCCASKVLVGCWFSASRQLRPNNTLLFHLRVLWGSKMVSAGVALGVSLLSSSL 120
Pb03      -----MVSAGVALGVSLLSSSL 18
Pb18      -----MVSAGVALGVSLLSSSL 18
                *****

Pb01      LASSQSLSDCHNHGSTLFCVGDGTEVPVSTSMSTMPQTSQPNITTTTGGPQTAITSC 180
Pb03      LASSQSLSDCHNHGSTLFCVGDGTEVPVSTSMSTMPQTSQSNITTTTGGPQTAITSC 78
Pb18      LASSQSLSSCHTHGSTLFCVGDGTEVPVSTSMSTMPQTSQSNITTTTGGPQTAITSC 78
                *****

Pb01      HTHGPQTFVCVQNGDEVEVSALGTPPTVPVPAQFTNCHMHGDRFCVGSHEVKVLMPSQ 240
Pb03      HTHGPQTFVCVQNGDEVEVSALGTPPTVPVPAQFTNCHMHGDRFCVGSHEVKVLMPSQ 138
Pb18      HTHGPQTFVCVQNGDEVEVSALGTPPTVPVPAQFTNCHMHGDRFCVGSHEVKVLMPSQ 138
                *****

Pb01      TSGADQHG-HGQGMPSCHFHHGGVEHCNGDADNSAPVSCERRDRNYNVLRIGSLFAILA 299
Pb03      TSGAGQHG-HGQGMPSCHFHHGGVEHCNGDADNSAPVSCERRDRNYNVLRIGSLFAILA 197
Pb18      TSGAGQHGGHGGQGMQQSCHFHHGGVEHCNGDADNSAPVSCERRDRNYNVLRIGSLFAILA 198
                *****

Pb01      TSGIAVFGPILWARFFNSSLNGVVFTIIKQFGTGIMVATAFVHLLTHAQLLFQNRCLRGL 359
Pb03      TSGIAVFGPILWARFFNSSLNGVVFTIIKQFGTGIMVATAFVHLLTHAQLLFQNRCLRGL 257
Pb18      TSGIAVFGPILWARFFNSSLNGVVFTIIKQFGTGIMVATAFVHLLTHAQLLFQNRCLRGL 258
                *****

Pb01      NYEATTAIVMAGIFLSFLVEYIGNRIILARIPDSKPHVHGDAELEPNSEVQSKIPQAKS 419
Pb03      NYEATTAIVMAGIFLSFLVEYIGNRIILARIPDSKPHVHGDAELEPNSEVQSKIPQAKS 317
Pb18      NYEATTAIVMAGIFLSFLVEYIGNRIILARIPDSKPHVHGDAELEPNSEVQSKIPQAKS 318
                *****

Pb01      PNGSDNEPSSTLTNLGHQHTLVQPDDKLSVMTTHENLP---VIGLTLVLAGDSGYISL 475
Pb03      PNGSDNEPSSTLTNLGHQHTLVQPDDKLSVMMEAGIIFHSIIIGLTLVLAGDSGYISL 377
Pb18      PNGSDSEPPSTLTNLGHQHTLVQPDDKLSVMMEAGIIFHSIIIGLTLVLAGDSGYISL 378
                *****

Pb01      FIVIIFHQMFEGLALGARIANLKTTVTASKLTMALMFSLITPVGMAIGLVLHRFNGNDR 535
Pb03      FIVIIFHQMFEGLALGARIANLKTTVTASKLTMALMFSLITPVGMAIGLVLHRFNGNDR 437
Pb18      FIVIIFHQMFEGLALGARIANLKTTVTASKLTMALMFALITPVGMAIGLVLHRFNGNDR 438
                *****

Pb01      STIIAIGTLDALSAGILAWVALIDMWSHDWLYGDLRNSGFVKSAVGFLGIAGMVLMGLL 595
Pb03      STIIAIGTLDALSAGILAWVALIDMWSHDWLYGDLRNSGFVKSAVGFLGIAGMVLMGLL 497
Pb18      STIIAIGTLDALSAGILAWVALIDMWSHDWLYGDLRNSGFVKSAVGFLGIAGMVLMGLL 498
                *****

Pb01      GKWA 599
Pb03      GKWA 501
Pb18      GKWA 502
                ****

```

Figura 9: Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos de Zrt2 do isolado *Pb01*, com proteínas homólogas em *P. brasiliensis*. As sequências correspondentes a Zrt2 são: isolado 01 de *P. brasiliensis* (número de acesso no GenBank DS 572817; número de acesso no banco de dados do genoma estrutural de *P. brasiliensis* PAAG_03419.1); isolado 03 de *P. brasiliensis* (número de acesso no banco de dados do genoma estrutural de *P. brasiliensis* PABG_07098.1); isolado 18 de *P. brasiliensis* (número de acesso no banco de dados do genoma estrutural de *P. brasiliensis* PADG_06417.1). Posições de identidade completa são indicadas com asterisco (*), dois pontos (:) indicam substituições conservadas e um ponto (.) indica uma substituição semi-conservada. O primeiro e o último aminoácido de cada sequência estão em negrito. Os sítios de *N*-glicosilação estão marcados com preenchimento em cinza

Tabela 6 – Identidade e similaridade das sequências deduzidas de aminoácidos referentes às possíveis proteínas envolvidas na homeostase de zinco em *P. brasiliensis*

<i>P. brasiliensis</i>	X	<i>S. cerevisiae</i> *	Identidade (%)	Similaridade (%)
Fator de transcrição zinco-dependente (<i>PbC2h2</i>)		CAA89347.1	70%	79%
Transportador de cátion divalente (<i>PbCch</i>)		NP010435	50%	65%
Transportador de cálcio e zinco (<i>PbCa</i>)		CAA59762	40%	43%
Proteína zinco-dependente (<i>PbGata</i>)		CAA60126-1	60%	61,5%

*Número de acesso no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>).

V. 3 – Análise da expressão dos transportadores de alta e de baixa afinidade de ferro e zinco em células leveduriformes de *P. brasiliensis* cultivadas em diferentes concentrações de sulfato de zinco.

Células leveduriformes do fungo foram cultivadas em meio MMcM modificado, em condições com 0 μM , 2,75 μM , 10 μM e 1,0 mM de sulfato de zinco (ZnSO_4), durante 1 h de incubação, objetivando avaliar a expressão dos genes referentes aos transportadores de alta e baixa afinidade, *PbZrt1* e *PbZrt2*. O crescimento do fungo nas condições teste e na condição controle (condição em que não houve a adição de ZnSO_4 ao meio) foi similar (dados não mostrados). Em seguida, os RNAs obtidos na condição controle e nas condições de 2,75 μM , 10 μM e 1,0 mM foram utilizados para a avaliação dos níveis de expressão gênica por qRT-PCR, em tempo real, em triplicatas biológicas. Os resultados obtidos demonstraram que a expressão do gene *Pbzrt1* foi induzida sob a condição de cultivo controle, em que não havia a presença de ZnSO_4 e gradativamente diminuiu nas condições de cultivo celular com 2,75 μM , 10 μM e 1,0 mM de ZnSO_4 (**Figura 10**, painel A). Já para o gene *Pbzrt2* foi observada uma indução gradativa em sua expressão na presença de ZnSO_4 em relação ao controle (**Figura 10**, painel B).

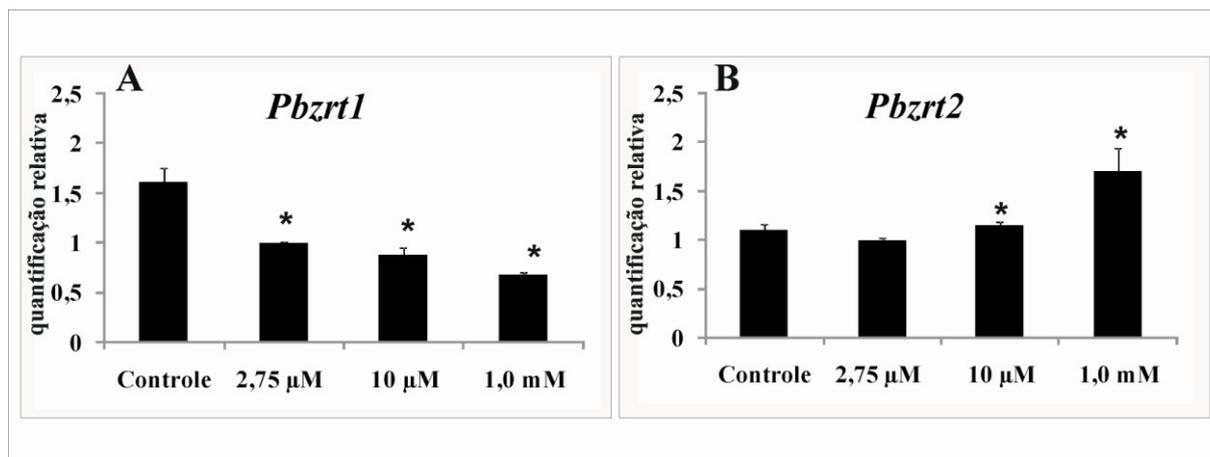


Figura 10: Análise da expressão dos genes *Pbzrt1* e *Pbzrt2* em diferentes concentrações de sulfato de zinco (ZnSO_4). A expressão dos genes foi avaliada através de qRT-PCR em tempo real, em diferentes condições experimentais. (A) perfil de expressão de *Pbzrt1* em células leveduriformes de *P. brasiliensis* cultivadas em 2,75 μ M, 10 μ M e 1,0 mM de ZnSO_4 . (B) perfil de expressão de *Pbzrt2* em células leveduriformes de *P. brasiliensis* cultivadas em 2,75 μ M, 10 μ M e 1,0 mM de ZnSO_4 . Os valores da expressão dos genes foram normalizados utilizando-se os valores de expressão do gene constitutivo codificante para a proteína ribossomal L34. Análises estatísticas para avaliar o nível de significância foram realizadas, utilizando o teste de *t* Student, adotando $p \leq 0,05$ (*).

V. 4– Experimentos de depleção de zinco em *P. brasiliensis*.

Com o intuito de padronizar o uso do quelante específico de zinco, TPEN, avaliando as variáveis tempo de incubação e concentração ótima desse agente químico, foi realizado o experimento de avaliação da viabilidade celular de *P. brasiliensis*, no qual células leveduriformes do fungo foram cultivadas em meio MMcM modificado, com as seguintes concentrações de TPEN: 0,125 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 1,0 mM e 2,0 mM, em 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 24 h de incubação. Para cada condição teste, referente à concentração de quelante e ao tempo de incubação celular havia uma condição controle, com células leveduriformes cultivadas em meio MMcM sem o complemento de quelante e sob mesma temperatura de incubação. Durante as análises de viabilidade celular observou-se que células leveduriformes

de *P. brasiliensis* quando crescidas nas concentrações de 1,0 e 2,0 mM do quelante TPEN e incubadas durante 1 h apresentavam-se inviáveis (dados não mostrados) (**Figura 11**). O resultado obtido mediante as contagens celulares originou um gráfico que demonstra que as células leveduriformes do fungo são viáveis durante um maior período de incubação quando cultivadas com 0,125 mM e 0,25 mM do quelante de zinco TPEN.

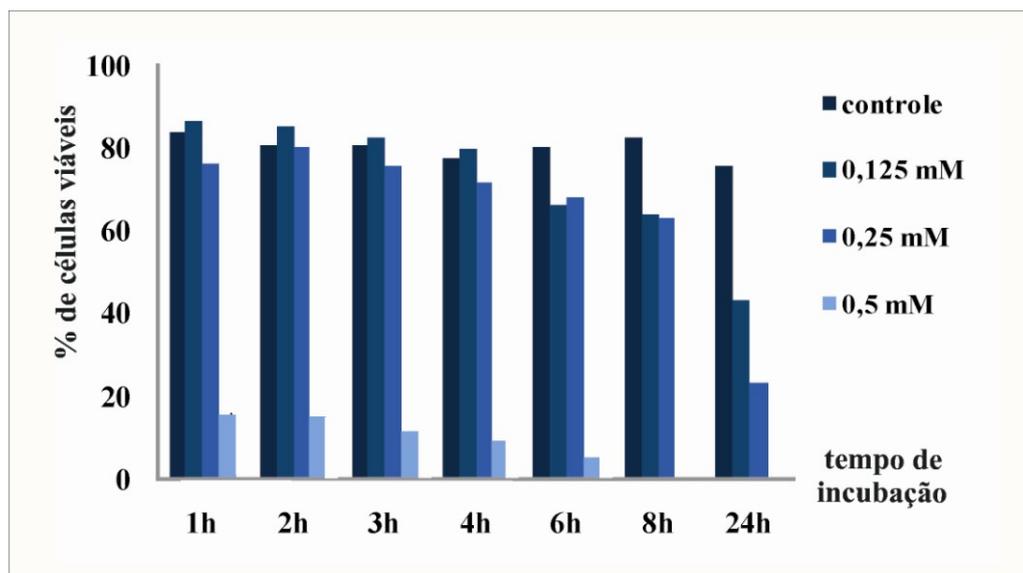


Figura 11: Viabilidade celular de *P. brasiliensis* na presença do quelante de zinco (TPEN). Células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* crescidas em diferentes concentrações do quelante específico de zinco TPEN; em 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 24 h de incubação.

Diante dos resultados de viabilidade celular obtidos foram extraídos RNAs das células cultivadas nas concentrações de 0,125 mM e de 0,25 mM do quelante TPEN durante 4 h e 6 h de incubação. A partir desses RNAs, cDNAs foram sintetizados e em seguida utilizados para avaliar, através de qRT-PCR em tempo real a expressão do gene *Pbzrt1*. Os resultados mostraram que o gene *Pbzrt1* possui uma maior expressão em células cultivadas com 0,125 mM de quelante de zinco durante 4 h (**Figura 12**).

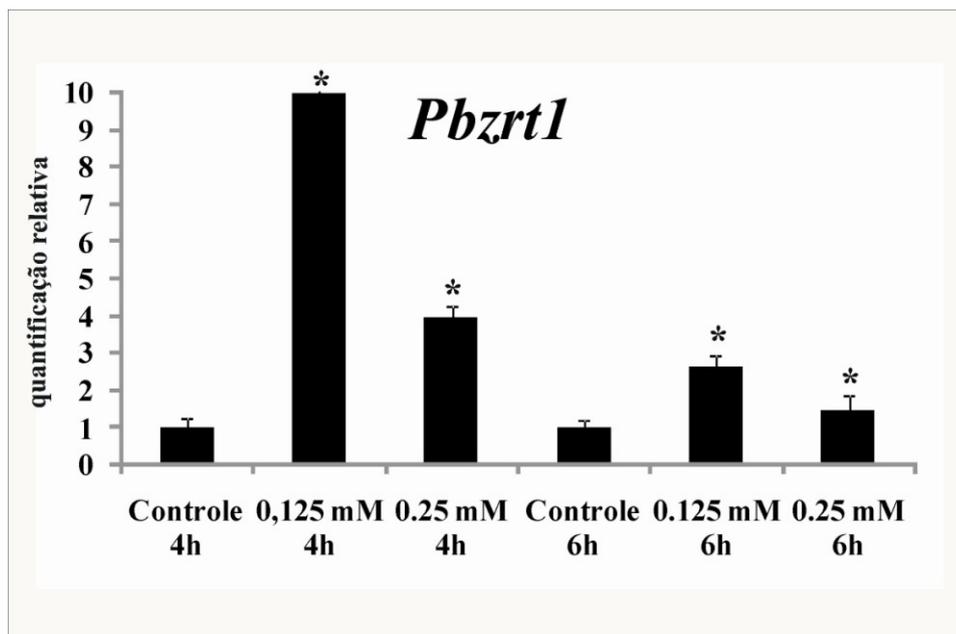


Figura 12: Análise da expressão gênica de *Pbzrt1* em condições de depleção de zinco em *P. brasiliensis*. O nível de expressão gênica de *Pbzrt1* foi avaliado através de qRT-PCR em tempo real durante o cultivo celular do fungo nas concentrações de 0,125 mM e 0,25 mM do quelante de zinco TPEN, nos períodos de incubação de 4 h e 6 h e com ausência de quelante de zinco (controle). Os valores da expressão do gene foram normalizados utilizando-se em relação ao gene constitutivo codificante para a proteína ribossomal L-34. Análises estatísticas para avaliar o nível de significância foram realizadas, utilizando o teste *t* Student, adotando $p \leq 0,05$ (*).

Foi realizada a técnica qRT-PCR em tempo real, também para avaliar a expressão dos genes referentes ao transportador de baixa afinidade *Pbzrt2*, ao transportador de cátion divalente *Pbccch* e a proteína zinco -dependente *Pbgata* (**Figura 13**). Os resultados revelaram que em células leveduriformes de *P. brasiliensis* cultivadas durante 4 h sob condição de depleção de zinco, na concentração de 0,125 mM do quelante TPEN, ocorre indução dos genes *Pbzrt1* e *Pbzrt2* em relação ao controle (ausência de quelante). Por outro lado, os genes *Pbgata*, *Pbccch* mostraram expressão diminuída comparado ao controle (ausência de quelante).

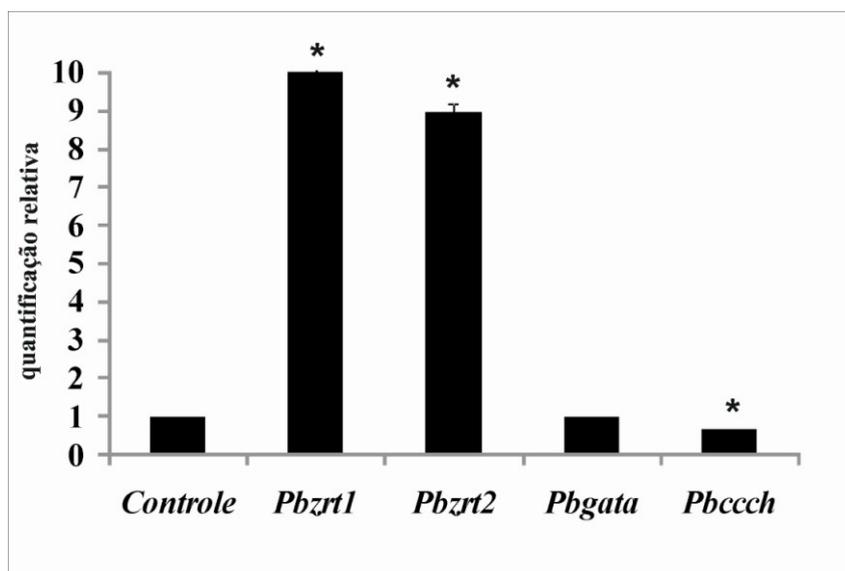


Figura 13: Análise da expressão de genes envolvidos na manutenção da homeostase de ferro e zinco em *P. brasiliensis*. A expressão gênica foi avaliada através de qRT-PCR em tempo real, sob condições de depleção de zinco, utilizando o quelante TPEN. O gráfico acima representa o perfil de expressão dos genes *Pbzrt1*, *Pbzrt2*, *Pbgata* e *Pbccch* em células crescidas com adição de 0,125 mM de quelante TPEN, durante 4 h de incubação, em relação a condição controle (sem adição de TPEN). Os valores da expressão dos genes foram normalizados utilizando-se os valores de expressão do gene constitutivo codificante para a proteína ribossomal L-34. Análises estatísticas para avaliar o nível de significância foram realizadas, utilizando o teste *t* Student, adotando $p \leq 0,05$ (*).

V. 5– Análise da expressão dos possíveis genes envolvidos na homeostase de zinco durante a depleção de ferro e cobre em *P. brasiliensis*.

Com o objetivo de analisar a expressão dos genes codificantes dos transportadores de ferro e zinco de alta e de baixa afinidade *PbZrt1* e *PbZrt2*, do transportador de cátion divalente *PbCcch*, da proteína zinco-dependente *PbGata*, do transportador de Cálcio/Zinco *PbCa* e do fator de transcrição *PbC₂H₂*, durante ausência de ferro e cobre, células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* foram cultivadas na presença de quelantes específicos de ferro, BPS e de cobre, BCS. É importante ressaltar que o crescimento do fungo nas

condições teste e controle foi similar (dados não mostrados). Os níveis de expressão gênica foram avaliados por qRT-PCR em tempo real em triplicatas biológicas. Os resultados demonstraram que a expressão dos genes *Pbzrt1* e *Pbzrt2* foi induzida em células crescidas durante um período de 3 h de incubação, em meios depletados para ferro e para ferro e cobre, se comparado à condição controle (**Figura 14**, painéis A e B). No entanto, para células leveduriformes cultivadas em meio depletado para ferro, durante um período de 18 h de incubação foi observado que o perfil de expressão de *Pbzrt1* foi similar ao encontrado para a condição controle (**Figura 14**, painel C). Os resultados indicaram ainda uma indução dos genes *Pbgata* e *Pbccch* em células tratadas com o quelante específico para cobre, embora *Pbccch* tenha sido induzido também em condições de depleção de ferro e ferro e cobre, se comparado ao controle (**Figura 14**, painéis D e E). Os genes *Pbc₂h₂* e *Pbca* apresentaram uma expressão significativamente menor que o controle nas condições de depleção de ferro, cobre e de ferro e cobre (**Figura 14**, painéis F e G).

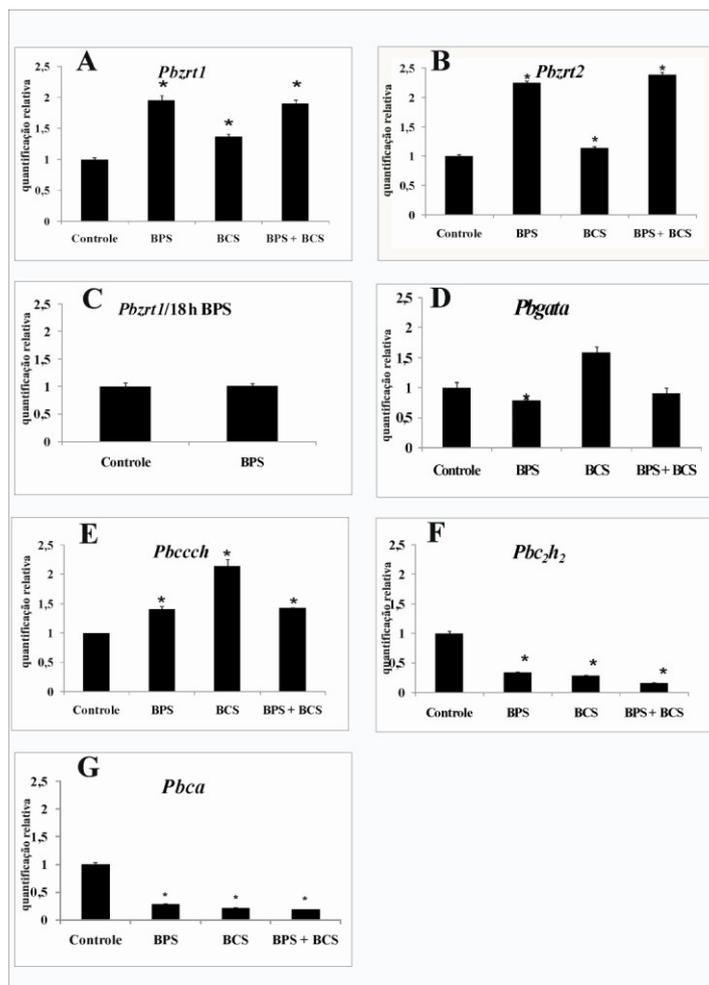


Figura 14: Análise da expressão de genes envolvidos na via de homeostase de zinco em células leveduriformes de *P. brasiliensis* cultivadas na ausência de ferro e cobre. A expressão dos genes de *P. brasiliensis* foi avaliada através de qRT-PCR em tempo real em diferentes condições experimentais (controle, depleção de ferro, depleção de cobre e depleção de ferro e cobre). (A) perfil de expressão do gene *Pbzrt1* em células cultivadas em meio com adição de BPS, BCS e BPS/BCS, durante 3 h de incubação. (B) perfil de expressão do gene *Pbzrt2* em células cultivadas em meio com adição de BPS, BCS e BPS/BCS, durante 3 h de incubação. (C) perfil de expressão do gene *Pbzrt1* em células cultivadas em meio com adição de BPS, durante 18 h de incubação. (D) perfil de expressão do gene *Pbgata* em células cultivadas em meio com adição de BPS, BCS e BPS/BCS, durante 3 h de incubação. (E) perfil de expressão do gene *Pbccch* em células cultivadas em meio com adição de BPS, BCS e BPS/BCS, durante 3 h de incubação. (F) perfil de expressão do gene *Pbc₂h₂* em células cultivadas em meio com adição de BPS, BCS e BPS/BCS, durante 3 h de incubação. (G) perfil de expressão do gene *Pbca* em células cultivadas em meio com adição de BPS, BCS e BPS/BCS, durante 3 h de incubação. Os valores da expressão dos genes foram normalizados utilizando-se os valores de expressão do gene constitutivo codificante para a proteína ribossomal L-34. Análises estatísticas para avaliar o nível de significância foram realizadas, utilizando o teste *t* Student, adotando $p \leq 0,05$ (*).

V.6 – Perfil da expressão de genes codificantes para os transportadores de alta e de baixa afinidade de ferro e zinco em células leveduriformes de *P. brasiliensis* derivadas de baço de animais infectados.

Os níveis de expressão de *Pbzrt1* e *Pbzrt2* foram avaliados por qRT-PCR em tempo real em células leveduriformes de *P. brasiliensis* derivadas de baço de camundongos infectados durante 15 dias (**Figura 15**). O gene *Pbzrt1* apresentou uma expressão significativamente maior que o controle na infecção (**Figura 15**, painel A), enquanto que o gene *Pbzrt2* (**Figura 15**, painel B) apresentou uma baixa expressão se comparado ao controle.

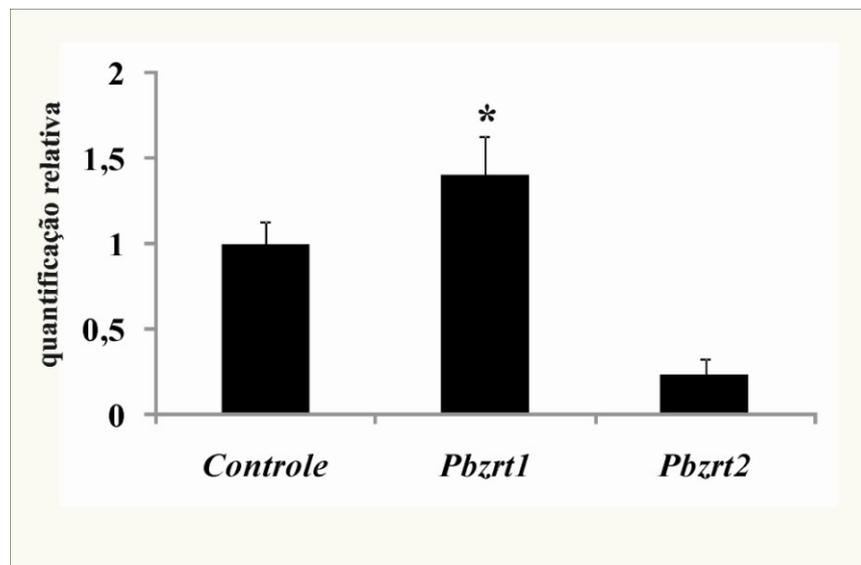


Figura 15: Análise da expressão dos genes *Pbzrt1* e *Pbzrt2* durante o processo infectivo. A expressão dos genes foi avaliada através de qRT-PCR sob condições de infecção experimental. (A) expressão de *Pbzrt1* em células leveduriformes derivadas de infecção em baço. (B) expressão de *Pbzrt2* em células leveduriformes derivadas de infecção em baço. Os valores da expressão dos genes foram normalizados utilizando-se os valores de expressão do gene constitutivo codificante para a proteína ribossomal L-34. Análises estatísticas para avaliar o nível de significância foram realizadas, utilizando o teste *t* Student, adotando $p \leq 0,05$ (*).

V- Discussão

Metais de transição, como zinco, ferro e cobre são micronutrientes essenciais para o desenvolvimento de inúmeros processos vitais. Dessa forma, para que microrganismos patogênicos se proliferem em tecidos do hospedeiro e tenham um processo infectivo bem-sucedido, esses patógenos desenvolveram mecanismos específicos de alta e de baixa afinidade que garantem a captação de metais que são pouco disponíveis em tecidos de mamíferos e de outros animais (Eide, 1998; Lullof *et al.*, 2004).

O início dos estudos acerca dos mecanismos que envolvem, tanto a captação, quanto a homeostase de metais em microrganismos patogênicos eucariotos foi possível, mediante os estudos realizados na última década, com a levedura *S. cerevisiae*. Dessa forma, através do rastreamento de genes ortólogos envolvidos no processo de captação de zinco, Kim *et al.* (2008), isolaram o gene *crs1*, responsável pela transcrição zinco-responsiva, em *C. albicans*. Bailão *et al.* (2006) e Bailão *et al.* (2007), no intuito de identificar genes do fungo *P. brasiliensis* induzidos durante o processo infectivo e expressos durante o contato do fungo com plasma humano, ao utilizarem a técnica de Análise de Diferença Representacional de cDNA (cDNA-RDA), encontraram alta frequência dos transcritos *Pbzrt1* e *Pbzrt2*, codificando os transportadores de alta e de baixa afinidade de ferro e zinco. Diante disso iniciou-se a investigação dos possíveis genes ligados à homeostase de zinco no fungo *P. brasiliensis*.

Foram identificados ortólogos de possíveis genes envolvidos na homeostase de zinco em *P. brasiliensis*, através de análises no banco de dados do genoma estrutural de *P. brasiliensis* (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html). Dentre os genes identificados pode-se citar aqueles codificantes para o transportador de alta afinidade de ferro e zinco (*PbZrt1*), o transportador de baixa afinidade de ferro e zinco (*PbZrt2*), o transportador de cátions divalentes (*PbCcch*) possivelmente

localizado no Retículo Endoplasmático, o transportador de cálcio e zinco (*PbCa*) possivelmente localizado no Retículo Endoplasmático, os transportadores de zinco intravacuolares (*PbCot* e *PbCdf*) e uma proteína zinco-dependente (*PbGata*). Além disso, as análises *in silico* revelaram o gene *Pbc_{2h2}*, descrito como regulador da expressão dos transportadores de alta e de baixa afinidade de zinco em *S. cerevisiae* (**Figura 7**). Rutherford & Bird (2004), descreveram que sob condições limitantes de zinco, em *S. cerevisiae* esse fator transcricional aumenta a expressão dos genes codificantes para os transportadores *Zrt1* e *Zrt2*, de alta e baixa afinidade, respectivamente.

Análises baseadas no alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos para os transportadores *PbZrt1* e *PbZrt2* através do programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) revelam identidade e similaridade tanto para transportador de alta afinidade de zinco *PbZrt1*, quanto para o transportador de baixa afinidade *PbZrt2*, nos três isolados do fungo *P. brasiliensis*. Foram identificados ainda sítios de *N*-glicosilação e sítios ricos em resíduos de histidina para o transportador *PbZrt1* e sítios de *N*-glicosilação para o transportador *PbZrt2* o que já é descrito por Eide (1998), por Gaither & Eide (2001) e por Van Ho *et al.* (2002) em transportadores de alta e de baixa afinidade de *S. cerevisiae*.

Os resultados obtidos através da técnica de qRT-PCR em tempo real, utilizando cDNAs oriundos de células leveduriformes de *P. brasiliensis* crescidas tanto em meio de cultura MMcM complementado com diferentes concentrações de ZnSO₄; quanto em meio de cultura MMcM, complementado com 0,125 mM do quelante específico de zinco TPEN demonstram que a expressão do gene *Pbzrt1* (transportador de alta afinidade de ferro e zinco) foi induzida em células crescidas na ausência de ZnSO₄ e na presença de TPEN (**Figura 10**, painel A; **Figura 12** e **Figura 13**). Essas análises são similares aos resultados discutidos em estudos prévios com transportador de alta afinidade de zinco, utilizando a levedura *S. cerevisiae* crescida em meio de cultura com diferentes concentrações do referido metal. O

transportador de alta afinidade foi induzido somente em células crescidas em meio depletado para zinco (Zhao & Eide, 1996a, Van Ho *et al.*, 2002). Sabe-se que os transportadores de alta e de baixa afinidade de zinco possivelmente são as principais moléculas envolvidas diretamente no processo de manutenção da homeostase do referido metal, justificando assim a indução simultânea dessas duas permeases em células leveduriformes de *P. brasiliensis* cultivadas na presença do quelante específico de zinco TPEN (**Figura 13**). Pode-se ainda observar com esses resultados que o gene *Pbzrt2* (transportador de baixa afinidade de ferro e zinco) foi induzido na presença de $ZnSO_4$ (**Figura 10, painel B**). Zhao & Eide (1996b), ao cultivarem cepas de *S. cerevisiae* mutadas tanto para *zrt1*, quanto para *zrt2*, em meio de cultura SD complementado com diferentes concentrações de zinco, observaram que o gene *zrt2* é expresso de forma constitutiva, sugerindo assim que o transporte de baixa afinidade é o mecanismo mais eficiente de captura de zinco disponível no meio extracelular.

Para melhor compreendermos o comportamento da suposta via de homeostase de zinco proposta nesse trabalho, o cDNA proveniente das células tratadas com o quelante de zinco TPEN foi utilizado também em experimentos de qRT-PCR em tempo real, envolvendo os genes *Pbccch* e *Pbgata*. As análises obtidas em relação ao gene *Pbccch* revelaram que o mesmo apresentou-se significativamente menor que o controle. O fato do quelante TPEN se ligar a íons zinco tanto em meio intracelular, quanto em meio extracelular pode estar associado à diminuição da expressão do gene *Pbccch*, pois a ligação de íons zinco ao quelante provavelmente impede que esse metal seja transportado através da permease *PbCcch*. A ausência de íons zinco em meio intracelular explica ainda a diminuição na expressão do gene *Pbgata*, que codifica uma proteína zinco dependente. Resultados semelhantes foram observados por Trainor *et al.*, (2000) que relataram a dependência existente entre a proteína Gata e íons zinco. Entretanto, as análises realizadas através de qRT-PCR em tempo real de *Pbgata* em células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis*

tratadas com os quelantes específicos para ferro e para cobre, BPS e BCS, respectivamente revelaram que esse gene apresentou uma menor expressão em células tratadas com BPS e BPS/BCS, quando comparadas a condição controle (**Figura 14**, painel D), o que sugere que em *P. brasiliensis* a proteína Gata seja tanto dependente de zinco quanto de ferro.

Sabiha *et al.* (2009), com o objetivo de estudar o envolvimento entre o transporte e a homeostase de zinco e de ferro no fungo *A. fumigatus* basearam-se nas investigações realizadas por Waters & Eide (2002) e observaram que tanto o transporte, quanto a homeostase de zinco e de ferro estão intrinsecamente ligadas. Por exemplo, os íons zinco interferem de maneira drástica na captura de ferro, o que contribui para uma menor virulência do fungo em tecidos hospedeiros. No intuito de averiguar a correlação existente entre o transporte e a homeostase de zinco em relação a outros metais, foi avaliado através de qRT-PCR em tempo real, o perfil de expressão dos possíveis genes ligados ao metabolismo de zinco em *P. brasiliensis*, utilizando o cDNA de células leveduriformes do fungo crescidas em meio depletado para ferro, cobre e para ferro e cobre.

Os resultados obtidos demonstram que genes *Pbzrt1* e *Pbzrt2* apresentaram uma expressão significativamente maior que o controle em células cultivadas na presença de BPS (**Figura 14**, painéis A e B). Esses resultados sugerem que os transportadores *PbZrt1* e *PbZrt2* possuam afinidade por íons ferro, o que torna ainda mais forte a evidência de que em *P. brasiliensis* as permeases *PbZrt1* e *PbZrt2* capturem ferro do meio extracelular, ao menos durante um intervalo de tempo em que as células do fungo tenham sido submetidas a depleção do referido metal. Ressalta-se que as permeases classificadas como Zrt, podem transportar tanto íons zinco, quanto íons ferro, embora pouco se conheça sobre a afinidade dessas permeases por ferro (Gaither & Eide, 2001).

Ainda com o objetivo de estudar o transporte de ferro através da permease de alta afinidade de *P. brasiliensis*, análises da expressão gênica de *Pbzrt1* realizadas em células

cultivadas na presença de 50 μ M de BPS, durante 18h, por qRT-PCR em tempo real demonstraram que o gene *Pbzrt1* apresentou o mesmo perfil de expressão para as condições de depleção de ferro e controle (**Figura 14**, painel C). Pulg *et al.* (2008), discutem através de estudos utilizando a levedura *S. cerevisiae*, que a deficiência de ferro pode acarretar uma reprogramação metabólica; assim as células ao invés de utilizarem vias em que o ferro é empregado como fator co-enzimático utilizam outras vias metabólicas que garantem a viabilidade da levedura em meios depletados de ferro.

As análises através de qRT-PCR em tempo real ainda revelaram que o gene *Pbc₂h₂*, responsável por codificar o fator de transcrição zinco-responsivo, apresenta-se menos expresso em células crescidas em meio complementado com os quelantes BPS, BCS e BPS/BCS (**Figura 14**, painel F). Esse resultado corrobora os resultados de Zhao & Eide (1997), que observaram que os genes codificantes para os fatores de transcrição, Aft1 (ferro-responsivo), Mac1 (cobre-responsivo) e Zap1 (zinco-responsivo) podem possuir elementos comuns referentes à regulação gênica, em *S. cerevisiae*, quando cultivado em ambiente depletado de ferro, cobre e zinco.

Os resultados acerca da expressão do gene *Pbccch*, que codifica um transportador de cátions divalentes, mostraram que houve indução em sua expressão nas células cultivadas na presença dos quelantes BPS, BCS e BPS/BCS, sendo a indução predominante na presença de BCS (**Figura 14**, painel E). Diante disso, sugere-se que esse transportador de cátions divalentes possua uma maior afinidade por ferro se comparada ao cobre, já que nas células tratadas com BPS sua expressão é diminuída. Outro resultado observado foi a expressão do gene que codifica a permease responsável por transportar íons cálcio e zinco, *PbCa*, significativamente menor que o controle em células tratadas com BPS, BCS e BPS/BCS (**Figura 14**, painel G). Sabe-se que íons, como cobre, ferro, zinco, cádmio e alumínio competem por sítios de ligação de diversas proteínas (Zhao e Eide, 1996a, Gaither & Eide,

2001). Diante disso, o resultado sugere que o transporte de ferro e cobre através dos transportadores *PbZrt1* e *PbZrt2* possa diminuir a entrada de zinco para o meio intracelular. Assim a indução da expressão do gene *Pbca* torna-se desnecessária. De acordo com o conjunto de resultados obtidos torna-se relevante a sugestão da existência de uma rede responsável pela geração da homeostase de metais no fungo *P. brasiliensis*, assim como foi observado para *S. cerevisiae* e *A. fumigatus* (Waters & Eide, 2002; Jbel *et al.*, 2008; Sabiha *et al.*, 2009).

A expressão dos transportadores *PbZrt1* e *PbZrt2* também foi analisada durante o processo infectivo. Diante dos resultados obtidos foi observada uma indução na expressão do gene *Pbzrt1* em baço dos camundongos infectados, enquanto que o gene *Pbzrt2* apresentou uma baixa expressão (**Figura 15**). Considerando que o zinco é um micronutriente essencial para o processo de formação dos eritrócitos é relevante o fato de que esse metal se encontre pouco disponível em tecidos do baço (Mafra & Cozzolino, 2000). Dessa forma, pode-se sugerir que *PbZrt1* participa na captura de íons zinco durante a infecção, desempenhando, assim um papel essencial na estratégia de sobrevivência do patógeno em tecidos do hospedeiro.

Muitos são os papéis desempenhados por íons metálicos na biologia de vários organismos e em mecanismos de virulência empregados por microrganismos patogênicos. No entanto, o conhecimento da regulação da homeostase de zinco e de outros metais, assim como a relação existente entre essas vias permanece escasso e, portanto, apresenta-se como um estudo nascente. Os resultados obtidos com esse trabalho corroboram para o fato de haver uma possível via de captação e homeostase de zinco em *P. brasiliensis* e de que essa via provavelmente esteja intrinsecamente ligada a outras que levam à homeostase de ferro, nesse fungo, assim como já foi estudado na levedura *S. cerevisiae* e em *A. fumigatus*. Mediante os resultados obtidos, através do perfil de expressão dos prováveis genes envolvidos na

homeostase de zinco e o cultivo de células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* tratadas com o quelante de cobre, BCS foi observado uma pequena relação entre a homeostase de zinco e íons cobre no fungo *P. brasiliensis*. A diferença de expressão entre transportadores de alta e de baixa afinidade, em experimentos de infecção experimental revelam que ambas as permeases possuam comportamentos diferentes no processo infeccioso. Diante os resultados observados, esse trabalho torna-se um dos pontos de partida para a continuação de estudos referentes à homeostase de metais em *P. brasiliensis*.

VI- Perspectivas

A partir dos resultados obtidos, as perspectivas são:

- Estudar o transporte vacuolar de zinco em células leveduriformes de *P. brasiliensis*.
- Construir bibliotecas subtraídas de cDNA a partir de RNAs obtidos a partir de leveduras de *P. brasiliensis* crescidas na presença e ausência de zinco.
- Realizar análises proteômicas em células leveduriformes de *P. brasiliensis* cultivadas na presença e ausência de zinco.
- Identificar as proteínas *PbZrt1* e *PbZrt2* no proteoma de *P. brasiliensis* através de espectrometria de massas.
- Obter transformantes do fungo *P. brasiliensis* deficientes na captura de zinco.

VII- Referências Bibliográficas

Almeida, A. J., Matute, D. R., Carmona, J. A., Martins, M., Torres, I., McEwen, J. G., Restrepo, A., Leao, C., Ludovico, P. e Rodrigues, F. (2007). Genome size and ploidy of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals a haploid DNA content: flow cytometry and GP43 sequence analysis. *Fungal Genet Biol* **44**(1) 25-31.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. e Lipman, D. A. (1990). Basic local alignment search tools. *J Mol Biol* **215**: 403-410.

Andrews, N. C. & Levy, J. E. (1998). Iron is hot: an update on the pathophysiology of hemochromatosis. *Blood* **92**(6): 1845-51.

Bailão, A. M., Schrank, A., Borges, C. L., Dutra, V., Molinari-Madlum, E. E. W. I., Felipe, M. S. S., Mendes-Giannini, M. J., Martins, W. S., Pereira, M. e Soares, C. M. A. (2006). Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: Representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microbes Infect* **8**(12-13): 2686-97

Bailão, A. M., Shrank, A., Borges, C. L., Parente, J. A., Dutra, V., Felipe, M. S. S., Fiúza, R. B., Pereira, M. e Soares, C. M. A. (2007). The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. *FEMS Immunol Med Microbiol* **51**: 43–57.

Berducci, G., Mazzetti, A. P., Rotilio, G. e Battistoni, A. (2004). Periplasmic competition for zinc uptake between the metallochaperone ZnuA and Cu,Zn superoxide dismutase. [FEBS Lett](#) **569**(1-3): 289-92.

Bird, A. J., Zhao, H., Luo, H., Jensen, L. T., Srinivasan, C., Evans-Galea, Winge, D. R. e Eide, D. J. (2000). A dual role for zinc fingers in both DNA binding and sensing by the Zap1 transcriptional activator. *EMBO J.* **19**(14): 3704-13.

Bookout, A. L., Cummins, C. L., Mangelsdorf, D. J., Pesola, J. M. e Kramer, M. F. (2006). High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR, p. 15.8.1-28. In F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (ed.), *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, Hoboken, NJ.

Brummer, E., Castaneda, E. e Restrepo, A. (1993). Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* **6**(2): 89-117.

Carrero, L. L., Niño-Vega, G., Teixeira, M. M., Carvalho, M. J., Soares, C. M., Pereira, M., Jesuino, R. S., McEwen, J. G., Mendoza, L., Taylor, J. W., Felipe, M. S. e San-Blas, G. (2008). New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol* **45**(5) 605-12.

Chiperfield, J. R. & Ratlege, C. (2000). Salicylic acid is not a bacterial siderophore: a theoretical study. *Biometals* **13**(2): 30009-18.

Conklin, D. S., Culbertson, M. R. e Kung, C. (1994). Interactions between gene products involved in divalent cation transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **244**(3): 303-11.

Conti-Diaz, I. A. (2007). On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*: our hypothesis of 1989: present status and perspectives. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **49**(2): 131-4

.

Dainty, S. J., Kennedy, C. A., Watt, S., Bahler, J. e Whitehall, S. K. (2008). Response of *Schizosaccharomyces pombe* to Zinc Deficiency. *Eukaryot Cell* **7**(3): 454-64.

Desbrosses-Fonrouge, A. G., Voight, K., Schroder, A., Arrivault, S., Trhoemine, S. e Kramer, U. (2005). Arabidopsis thaliana MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane wich mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation. FEBS Lett **579**(19): 4165-74.

Eide, D. J. (1998). THE MOLECULAR BIOLOGY OF METAL ION TRANSPORT IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. Annu Rev Nutr **18**: 441-69.

Eide, D. J. (2003). Multiple Regulatory Mechanisms Maintain Zinc Homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. J Nutr **133**(5 Suppl 1):1532S-5S.

Fava-Netto, C. (1955). Estudos quantitativos sobre a fixação de complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. Arq Cir Clin Exp S. P. **18**: 197-254.

Feitosa, L. S., Cisalpino, P. S., Santos, M. R., Mortara, R. A., Barros, T. F., Morais, F. V., Puccia, R., Silveira, J. F. e Camargo, Z. P. (2003). Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Fungal Genet Biol **39**(1): 60-9.

Fortes, R. M., Kipnis, A. e Junqueira-Kipnis, A. P. (2009). *Paracoccidioides brasiliensis* pancreatic destruction in *Calomys callosus* experimentaly infected. BMC Microbiol **7**(84) 1-11.

Franco, M. (1987). Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. J Med Vet Mycol **25**(1) 5-18.

Fraústo da Silva, J. J. R. & Williams, R. J. P. (2001). The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life, 2nd ed. Oxford University Press, New York, NY.

Gaither, L. A. & Eide, D. J. (2001). Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *BioMetals* **14**(2001): 251-70.

Gitan, R. S., Luo, H., Rodgers, J., Broderius, M. e Eide, D. (1998). Zinc-induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. *J Biol Chem* **273**(44):28617-24.

Haas, H., Eisendle, M. e Turgeon, B. G. (2008). Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu Rev Phytopathol* **46**:149-87.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. e Cross C. E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* **119**(6): 598-620.

Hofmann, K., Bucher, P., Falquet, L. e Bairoch, A. (1999). The Prosite Database, It's Status In 1999. *Nucleic Acids Res* **27**: 215-19.

Ibrahim, A. S., Spellberg, B. e Jr, J. E. (2008). Iron acquisition: a novel perspectives on mucormycosis pathogens and treatment. *Curr Opin Infect Dis* **21**: 620-65.

James, S. A., Collins, M. D. e Roberts, I. N. (1996). Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspota*. *Int J Syst Bacteriol* **46**(1): 189-94.

Jbel, M., Mercier, A., Pelletier, B., Beaudoin, J. e Labbé, S. (2009). Iron Activates In Vivo DNA Binding of *Schizosaccharomyces pombe* Transcription Factor Fep1 through Its Amino-Terminal Region. *Eukaryot Cell* **8**(4): 1-16.

Kim, Min-Jeong, Kil, M., Jung, J. H. e Kim, J. (2008). Roles of Zinc-responsive Transcription Factor Csr1 in Filamentous Growth of the Pathogenic Yeast *Candida albicans*. *J. Microbiol. Biotechnol* **18**(2): 242-47.

- Liuzzi, J. P., Lichten, L. A., Rivera, S., Blanchard, R. K., Aydemir, T. B., Knutson, M. D., Ganz, T. e Cousins RJ. (2005). Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(19):6843-8.
- Lullof, S. J., Hahn, B. L. e Sohnle, P. G. (2004). Fungal susceptibility to zinc deprivation. *J Lab Clin Med* **144**(4): 208-14.
- Lyons, T. J., Gasch, A. P., Gaither, A. L., Botstein, D., Brown, P. O. e Eide, D. J. (2000). Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. *PNAS* **97**(14): 7957-62.
- MacDiamird, C. W., Gaither, L. A. e Eide, D. (2000). Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **19**(12): 2845-55.
- Mafra, D. & Cozzolino, S. M. F. (2000). Zinco protoporfirina como parâmetro de deficiência de ferro na insuficiência renal crônica. *J Bras Nefro* **22**(3): 152-56.
- Matute, D. R., Sepulveda, V. E., Quesada, L. M., Goldman, G. H., Taylor, J. W., Restrepo, A. e McEwen, J. G. (2006). Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol* **44**(6) 2153-7.
- Mocchegani, E. & Muzzioli, M. (2000). Therapeutic Application of Zinc in Human Immunodeficiency Virus against Opportunistic Infections. *J Nutr* **130**(5S Suppl): 1424S-31S.
- Moreno, M. A., Ibrahim-Granet, O., Vicente-franqueira, R., Amich, J., Ave, P., Leal, F., Latgé, J. P. e Calera, J. A. (2007). The regulation of zinc homeostasis by the ZafA transcriptional activator is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *Mol Microbiol* **64**(5): 1182-97.
- Nelson, N. (1999). Metal ion transporters and homeostasis. *EMBO J* **18**(16): 4361-71.
- Nemecek, J. C., Wuthrich, M. e Klein, B. S. (2006). Global Control of Dimorphism and Virulence in Fungi. *Science* **312** (5773): 583-88.

Onodera, J. & Ohsumi, Y. (2005). Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J Biol Chem* **280**: 31582–86.

Outten, C. E., Tobin, D. A., Penner-Hahn, J. E. e O'Halloran, T. V. (2001). Characterization of the metal receptor sites in *Escherichia coli* Zur, an ultrasensitive zinc(II) metalloregulatory protein. *Biochemistry* **40**(35): 10417-23.

Pagani, M. A., Casamayor, A., Serrano, R., Atrian, S. e Ariño J. (2007). Disruption of iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **65**(2): 521-37.

Papanikolaou, G., & Pantopoulos, K. (2005). Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharm* **202**: 199–211.

Patzer, S. I. & Hantke, K. (1998). The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28**(11): 1199-1210.

Patzer, S. I. & Hantke, K. (2000). The zinc-responsive regulator Zur and its control of the znu gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**(32): 24321-32.

Philpott, C. C. (2006). Iron uptake in fungi: A system for every source. *Biochim Biophys Acta* **1763**(2006): 636-45.

Ramos-e-Silva, M. & Saraiva, L. E. S. (2008). Paracoccidioidomycosis. *Dermatol Clin* **26**(2008): 257-69.

Restrepo, A. & Jiménez, B. E. (1980). Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined medium. *J Clin Microbiol* **12**: 279-81.

Restrepo, A., Bernard, G., de Castro, C. C., Agudelo, C. A. e Tobón, A. M. (2008). Pulmonary Paracoccidioidomycosis. *Semin Respir Crit Care Med* **29**: 182-97.

Restrepo, A., McEwen, J. G. e Castaneda, E. (2001). The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol* **39**(3): 233-41.

Richie, D. L & Askew, D.S. (2008). Autophagy a role in metal ion homeostasis?. *Autophagy* **4**(1): 115-17.

Richini-Pereira, V. B., Bosco, S. D., Griese, J., Theodoro, R. C., Macoris, S. A., Da Silva, R. J., Barrozo, L., Tavares, P. M., Zancope-Oliveira, R. M. e Bagagli, E. (2007). Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol*: 1-6.

Rutherford, J. C. & Bird, A. J. (2004). Metal-Responsive Transcription Factors That Regulate Iron, Zinc, and Copper Homeostasis in Eukaryotic Cells. *Eukaryot Cell* **3**(1): 1-13.

Sabiha, Y., Abt, B., Schrettl, M., Moussa, T. A. A., Werner, E. R. e Haas, H. (2009). The Interplay between Iron and Zinc Metabolism in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* **46**(9):707-13.

San-Blas, G. & Niño-Vega, G. (2001). *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. *Fungal pathogenesis: principles and clinical application*. R. L. Cihlar and R. A. Calderone. New York, Marcel Dekker: 205-42.

San-Blas, G. (1993). Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* **31**(2): 99-113.

San-Blas, G. and Niño-Vega, G. (2004). Morphogenesis in Other Agents of Systemic Mycoses in: *Pathogenic Fungi: Structural Biology and Taxonomy*. Calderone R.A., Cihlar A.R. R.L. 2004.

San-Blas, G., Niño-Vega, G. e Iturriaga, T. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and *paracoccidioidomycosis*: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* **40**(3): 225-42.

Sano, A., Nishimura, K. e Miyaji, M. (1999). [The Research Encouragement Award. Effects of sex hormones on sexual difference of experimental paracoccidioidomycosis]. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **40**(1): 1-8.

Simm, C., Lahner, B., Salt, D., LeFurgey, A., Ingram, P., Yandell, B. e Eide, D. J. (2007). The Yeast Vacuole in Zinc Storage and Intracellular Zinc Distribution. *Eukaryot Cell* **6**(7):1166-77.

Stefanidou, M., Maravelias, C., Dona, A. e Spiliopoulou. (2006). Zinc: a multipurpose trace element. *Arch Toxicol* **80**(1): 1-9.

Sutak, R., Lesuisse, E., Tachezy, J. e Richardson, D. R. (2008). Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence. *Cell* **16**(6): 261-68.

Taborda, C. P., da Silva, M. B., Nosanchuk, J. D. e Travassos L. R. (2008). Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia* **165**(4-5): 331-39.

Teixeira, M. M., Theodoro, R. C., de Carvalho, M. J. A., Fernandes, L., Paes, H. C., Hahn, R. C., Mendoza L., Bagagli, E., San-Blas, G. e Felipe, M. S. S. (2009). Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol* **52**(2): 273-83.

Terçarioli, G., Bagagli, E., Reis, G., Theodoro, R., Bosco, S., Macoris, S. e Richini-Pereira, V. (2007). Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiology* **7**(1): 92.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. e Higgins, D. G. (1997). The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl Acids Res* **24**: 4876-82.

Trainor, C. D., Ghirlando, R. e Simpson, M. A. (2000). GATA Zinc Finger Interactions Modulates DNA Binding and Transactivation. *J Biol Chem* **275**(36): 28157-166.

Valera, E. T., Mori, B. M., Engel, E. E., Costa, I. S., Brandao, D. F., Nogueira-Barbosa, M. H., Queiroz, R. G., Silveira, V. D., Scrideli, C. A. e Tone, L. G. (2008). Fungal infection by *Paracoccidioides brasiliensis* mimicking boné tumor. *Pediatr Blood Cancer*.

VanHo, A., Ward, D. M. e Kaplan, J. (2002). Transition Metal Transport in Yeast. *Annu Rev Microbiol* **56**: 237-61.

Vicentefranqueira, R., Moreno M. A., Leal, F. e Calera, J. A. (2005). The *zfrA* and *zrfB* of *Aspergillus fumigatus* Encode the Zinc Transporter Proteins of a Zinc Uptake System Induced in an Acid, Zinc-Depleted Environment. *Eukaryot Cell* **4**(5): 837-48.

Waters, B. M. & Eide, D. J. (2002). Combinatorial Control of Yeast FET4 Gene Expression by Iron, Zinc, and Oxygen. *JBC* **277**(37): 33749-57.

Zhao, H. & Eide, D. (1996a). The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:2454-58.

Zhao, H. & Eide, D. (1996b). The *ZRT2* Gene Encodes the Low Affinity Zinc Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**(38): 23203-210.

Zhao, H. & Eide, D. J. (1997). Zap1p, a Metalloregulatory Protein Involved in Zinc-Responsive Transcriptional Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17**(9): 5044-52.

Zhao, H., Butler, E., Rodgers, J., Spizzo, T., Duesterhoeft, S. e Eide, D. (1998). Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the ZAP1 transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements. *J Biol Chem* **273**(44):28713-20.