



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

APARECIDO FERREIRA DE SOUZA

**Estudo da utilização de heme por *Paracoccidioides lutzii*: análise do
proteoma de parede celular após exposição à hemoglobina e
expressão heteróloga de Pga7, um provável receptor de
hemoglobina**

**Goiânia
2017**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

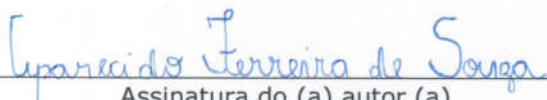
Nome completo do autor: Aparecido Ferreira de Souza.

Título do trabalho: Estudo da utilização de heme por *Paracoccidioides lutzii*: análise do proteoma de parede celular após exposição à hemoglobina e expressão heteróloga de Pga7, um provável receptor de hemoglobina.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (a)

Data: 03 / 03 / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

APARECIDO FERREIRA DE SOUZA

Estudo da utilização de heme por *Paracoccidioides lutzii*: análise do proteoma de parede celular após exposição à hemoglobina e expressão heteróloga de Pga7, um provável receptor de hemoglobina

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Célia Maria de Almeida Soares

Coorientador: Prof. Dr. Juliano Domiraci Paccez

**Goiânia
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Souza, Aparecido Ferreira de

Estudo da utilização de heme por *Paracoccidioides lutzii*: análise do proteoma de parede celular após exposição à hemoglobina e expressão heteróloga de Pga7, um provável receptor de hemoglobina. [manuscrito] / Aparecido Ferreira de Souza. - 2017.

XV, 99 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares; co orientador Dr. Juliano Domiraci Paccez.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Paracoccidioidomicose. 2. Ferro. 3. nanoUPLC-MSE. 4. Adesinas. 5. Interações patógeno-hospedeiro. I. Soares, Célia Maria de Almeida, orient. II. Título.

CDU 575



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 042

Aos vinte e um dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezessete (21/02/2017), às 09hs30min, no (a) Anfiteatro do ICB II, reuniram-se os componentes da banca examinadora: **Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares, Profa. Dra. Rosely Maria Zancopé Oliveira e Profa. Dra. Mirelle Garcia Silva Bailão** para, em sessão pública presidida pela primeira examinadora citada, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **"Estudo da utilização de heme por Paracoccidioides lutzii: Análise do proteoma de parede celular após a exposição à hemoglobina de Pga7, um provável receptor de hemoglobina."**, em nível de mestrado, área de concentração em **Genética e Biologia Molecular**, de autoria de **Aparecido Ferreira de Souza**, discente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela presidente, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em cerca de 40 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº 1294/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, a dissertação foi APROVADA, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da dissertação na secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11 horas e 30 minutos, encerrou-se a sessão de defesa e, para constar, eu, Gleizilene Braz Pereira dos Santos, Assistente em Administração do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que, após lida e aprovada, será assinada pelos membros da banca examinadora em três vias de igual teor.

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares
Presidente da Banca
UFG/GO

Profa. Dra. Rosely Maria Zancopé Oliveira
FIOCRUZ/RJ

Profa. Dra. Mirelle Garcia Silva Bailão
UFG/GO

Dedico esta dissertação a Deus e aos meus pais, Sr. Manoel Jorge de Souza e Sra. Jovita Ferreira Brito.

*“Tudo tem o seu tempo determinado, e
há tempo para todo propósito debaixo
do céu”.*

(Eclesiastes 3.1)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo: pelas situações que têm me conduzido ao amadurecimento; pelos diversos momentos em que me amparou em meio às dificuldades; pela oportunidade de conhecer pessoas incríveis e de viver momentos que sequer haviam visitado meus sonhos. Tenho visto como nunca que Deus “é poderoso para fazer muito mais abundantemente além daquilo que pedimos ou pensamos (Efésios 3.20)”.

Aos meus pais, Sr. *Manoel Jorge de Souza* e Sra. *Jovita Ferreira Brito*. Uma miríade de palavras ainda seria pouco para exprimir minha gratidão aos senhores. Vosso exemplo de honestidade, propiciado por um caráter sólido, consiste na premissa que emprego para a minha tomada de decisões. Vosso apoio tem sido imprescindível para que eu continue prosseguindo minha jornada. Sei que muitas vezes os senhores têm “feito das tripas coração” para me apoiar. Isso tudo só aumenta o meu sentimento de gratidão! Sou bem-aventurado por tê-los como pais.

À minha irmã *Anália Ferreira de Souza*, por incontáveis momentos de apoio e palavras de incentivo, além pelo fato de ter me concedido um dos maiores presentes que já recebi: o meu sobrinho *Christopher!* *Chris*, o seu sorriso me motiva a prosseguir! Obrigado por ter vindo iluminar os meus dias!

À Igreja *Evangélica Assembléia de Deus (ADPEL)* no Parque das Nações, na pessoa do Pr. *Welder Lobo*, por todo o apoio e orações. Ao Pr. *Jorge Rosa*, pelo apoio no início da minha jornada na Academia. Aos amigos *Elizeu Rodrigues*, *Welquis*, *Michel*, *Andressa Santos*, *Elisângela Silva* e *Dayane Fernandes* por vosso apoio e torcida. À Dr^a. *Wanessa do Carmo Ferreira* e à Dr^a. *Erika Torres*, cujas atuações foram indispensáveis num momento crítico, e me ajudaram a seguir a jornada. Muitíssimo obrigado!

À Prof^a. Dr^a. *Célia Maria de Almeida Soares*, por ter aceitado assumir a função de me orientar, apesar de até então não me conhecer. Sou grato por seu exemplo profissional inquestionável, o qual tem ajudado a nortear a minha carreira profissional. Muito além disso, agradeço por sua constante atenção e compreensão e, por incontáveis vezes, exprimir palavras de ânimo e conforto em meio aos diversos desafios enfrentados, além de preciosos conselhos que guardarei por toda a vida. Obrigado por sua confiança, empatia e incrível maestria no manejo das adversidades. Novamente, muito obrigado!

Ao Prof. Dr. *Juliano Domiraci Paccez*, por ter aceitado a coorientação deste trabalho e ter demonstrado um exemplo de dedicação e destreza em pesquisa do qual sou profundo admirador. Muito obrigado por todo o seu apoio! Ao Prof. Dr. *Wesley de Almeida Brito*, por seu otimismo contagiante e por ter me ajudado nos momentos iniciais do presente trabalho, concedendo palavras de incentivo e me apresentando caminhos para o entendimento de um mundo para mim até então desconhecido. Muito obrigado por sua atenção!

Aos professores Dr. *Alexandre Melo Bailão*, Dr. *Clayton Luiz Borges*, Dr^a. *Juliana Alves Parente* e Dr^a *Mirelle Garcia Silva-Bailão*, por diversos momentos de riquíssimas discussões sobre os experimentos e desafios encontrados, mas não apenas por isso. Agradeço por vossa atenção e diversos momentos de orientação profissional, além de conselhos valiosos que têm refletido positivamente na minha vida pessoal. Agradeço também às professoras Dr^a. *Maristela Pereira* e Dr^a *Silvia Maria Salem Izacc* por sempre mostrarem-se receptivas, e em tudo quanto precisei, terem prontamente me auxiliado.

Às Dr^{as}. *Laurine Lacerda Pigosso* e *Mariana Vieira Tomazett* por terem me recebido no Laboratório de Biologia Molecular da UFG, viabilizando minha inserção na rotina do laboratório, e continuamente terem me acompanhado durante os últimos dois anos. Obrigado por vossa atenção, por cada palavra de incentivo, por cada conselho, enfim, obrigado por terem aceitado esse “filhote”, hehe. À Dr^a *Lilian Cristiane Baeza* por todo o apoio na realização das análises proteômicas, um ofício até então por mim desconhecido. Sua gentileza e prestatividade são exemplos valiosos que tive a oportunidade de obter. Muito obrigado! À *Danielle Silva Araújo* por todo o apoio na obtenção de extratos de parede celular. Obrigado por sua atenção e ajuda, sem as quais dificilmente teria conseguido realizar essa parte do trabalho.

Ao *André Moreira*, o qual hoje tenho a oportunidade de chamar de amigo. Muito obrigado por sua atenção e exemplar prestatividade, as quais tornaram o dia-a-dia da pesquisa mais agradáveis. Quem dera se todos nesse mundo tivessem a empatia que você alberga. Obrigado por tudo!

À *Karla Sousa*, por sua singularidade marcante e constante atenção! À *Lana OHara*, por seu exemplo de determinação e apoio nas “batalhas diárias travadas na bancada”. *Karla* e *Lana*: obrigado por terem aberto o meu entendimento sobre a máxima “quem canta seus males espanta”, haha. À *Isabella Rosa*, por diversos

momentos em que compartilhamos nossas dificuldades, sempre culminando em palavras de otimismo e confiança.

Ao *Luiz Paulo, Leandro Assunção e Gabriel Tristão*, por vossa atenção e companheirismo, além de vosso exemplo de desenvoltura em pesquisa: sou fã de vocês. Ao *Kassyo Potenciano*, por valiosos momentos de discussão sobre nossas carreiras profissionais, além de seu exemplo de altíssima competência e dedicação! À *Juliana de Curcio e Marielle Silva*, por vossa atenção e inquestionável exemplo profissional! Obrigado por toda vossa ajuda em diversos momentos. Ao *Lucas Nojosa, Guilherme Petito, Davi Lima, Renato e Zairo*, por vossa gentileza e atenção. Obrigado por diversos momentos de “boa prosa” e descontração. Ao *Wanderson Costa*, por vários momentos valiosos de discussão de nossos experimentos, além de sua singularidade ao expor sua opinião. Aprendi muito contigo! À *Amanda, Livia, Meire Ane, Mariana Pedrosa, Vanessa, Kleber, Laura, Fabiana, Marta, Alex, Igor, Mirian e Bianca*, por diversos momentos de apoio e atenção.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Biologia Molecular, os quais agradeço especialmente à *Giovanna, Santiago e Gabriela*, pois vossa postura me incentiva a seguir essa jornada. Não poderia deixar de agradecer ao *Guilherme Algusto*, por sua brilhante atuação como aluno de iniciação científica e por ter me ajudado em diversos momentos, demonstrando atenção e prestatividade. Aos demais discentes que compõem o Laboratório de Biologia Molecular por terem me recebido de maneira tão fraterna. Externo minha gratidão pois a conclusão dessa etapa foi devido ao vosso apoio em diversos momentos.

Ao professor *Peixoto*, por ter aberto as portas da Academia para mim. Muito obrigado por seu exemplo profissional, mas, acima de tudo, seu exemplo de fraternidade. Sou bem-aventurado por ter iniciado meus passos na Academia sob sua orientação. Muitíssimo obrigado! Aos amigos do Replicon – PUC-GO, pela torcida e apoio. Agradeço especialmente à prof^a. *Daniela Silva*, ao prof. *Dr. Alex Silva da Cruz*, à prof^a. *Damiana Cunha*, à professora *Dr^a. Thaís Vieira*, ao *Raphael Silva da Cruz*, à *Nara Lúcia*, ao *Aldaires Melo*, ao *Douglas Rodrigues* e à *Lilian Teodoro*.

Às pessoas especiais, cujos exemplos motivaram minha decisão de seguir essa jornada: ao prof. *Dr. Fábio Silvestre Ataídes*; ao prof. *Dr. Xisto Sena Passos*; ao prof. *Dr. Antônio Márcio*; à professora *Yara Maia*; à professora *Keila de Alcântara* e à professora *Valéria Quixabeira*, docentes da Universidade Paulista – UNIP-GO.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo. A todos, por tudo!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ANEXOS.....	xi
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1. Aspectos gerais.....	1
1.2. A importância do Fe para sistemas biológicos	3
1.3. Potenciais fontes de Fe para patógenos no hospedeiro e imunidade nutricional	4
1.4. Mecanismos de captação de Fe por fungos	8
1.4.1. Assimilação reductiva de Fe por fungos patogênicos	9
1.4.2. Biossíntese e captação de sideróforos por fungos patogênicos	10
1.4.3. Captação de heme por fungos patogênicos	11
1.5. O gênero <i>Paracoccidioides</i> : aspectos gerais e filogenia.....	14
1.5.1. Paracoccidioidomicose: aspectos clínicos e epidemiológicos.....	15
1.6. Captação de Fe por <i>Paracoccidioides</i> spp.	18
1.7. Parede celular de <i>Paracoccidioides</i> spp.	21
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. Objetivo geral	25
3.2. Objetivos específicos	25
4. MÉTODOS	26
4.1. Isolado e condições de cultivo.....	26
4.2. Estudos de homologia.....	26
4.3. Extração de RNA e síntese de DNAC	27
4.4. Expressão heteróloga de <i>Pb01Pga7</i>	27
4.5. Digestão da proteína <i>Pb01Pga7</i> , <i>in gel</i> , com tripsina	29
4.6. Solubilização de <i>Pb01Pga7</i>	30
4.7. Extração de proteínas de parede celular	31
4.8. Preparo de amostras complexas para nanoUPLC-MS ^E	33
4.9. Cromatografia líquida de alta resolução, em nano escala, acoplada à espectrometria de massas.....	35
4.10. Processamento dos espectros e análises proteômicas	35

5. RESULTADOS.....	38
5.1. Expressão heteróloga de <i>Pb01pga7</i>	38
5.1.1. Novo estudo de homologia da sequência PAAG_02225	38
5.1.2. Amplificação de <i>Pb01pga7</i> e confirmação do alvo por sequenciamento.....	40
5.1.3. Confirmação de clonagem por PCR de colônias.....	42
5.1.4. Indução da expressão de <i>Pb01pga7</i>	43
5.1.5. Investigação da presença de códons raros para <i>E. coli</i> na sequência de <i>Pb01pga7</i>	44
5.1.6. Expressão de <i>Pb01pga7</i> após obtenção da sequência com códons otimizados.....	45
5.1.7. Solubilização de <i>Pb01Pga7</i>	47
5.2. Proteoma de parede celular após cultivo de <i>P. lutzii</i> na presença de hemoglobina	48
5.2.1. Proteoma da fração 1 de parede celular de <i>P. lutzii</i> após cultivo na presença de hemoglobina	48
5.2.2. Proteoma da fração 2 de parede celular de <i>P. lutzii</i> após cultivo na presença de hemoglobina	59
5.2.3. Proteoma de fração 3 de parede celular de <i>P. lutzii</i> após cultivo na presença de hemoglobina	66
5.2.4. Potenciais adesinas.....	72
6. DISCUSSÃO.....	74
6.1. Desafios enfrentados na expressão heteróloga de <i>PbPga7</i> e o advento de perspectivas para o estudo da proteína	74
6.2. Análise do proteoma de parede celular de <i>P. lutzii</i> evidencia a regulação positiva da expressão de adesinas e de sistemas antioxidantes após o tratamento do fungo com hemoglobina	77
7. CONCLUSÕES.....	82
8. PERSPECTIVAS.....	83
REFERÊNCIAS	84
ANEXOS.....	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da distribuição de ferro no organismo humano adulto	4
Figura 2. Representação esquemática das moléculas de heme e hemoglobina	6
Figura 3. Representação esquemática do metabolismo de heme no organismo humano	7
Figura 4. Representação esquemática do evento de captação de heme por <i>C. albicans</i>	13
Figura 5. Aspectos macroscópicos das fases miceliana e leveduriforme de <i>Paracoccidioides</i> spp.....	14
Figura 6. Lesões provocadas pela paracoccidioidomicose em diferentes formas clínicas	16
Figura 7. Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose com base na prevalência da doença em diferentes regiões.....	17
Figura 8. Mecanismos de captação de ferro em <i>Paracoccidioides</i> spp.	20
Figura 9. Representação esquemática da organização geral da parede celular de fungos	21
Figura 10. Mapa da construção pGEX-4T-1- <i>pga7</i>	29
Figura 11. Fluxograma do protocolo de extração de proteínas de parede celular	32
Figura 12. Alinhamento da sequência PAAG_02225 com Csa1 de <i>C. albicans</i>	39
Figura 13. Alinhamento da sequência PAAG_02225 com Pga7 de <i>C. albicans</i>	40
Figura 14. Amplificação de <i>Pb01pga7</i> e confirmação do alvo por sequenciamento	41
Figura 15. Triagem de colônias para pGEX-4T-3- <i>pga7</i> por PCR	42
Figura 16. A indução da expressão de <i>Pb01pga7</i> não foi efetiva.....	43
Figura 17. A sequência de <i>Pb01pga7</i> apresenta códons raros para expressão em <i>E. coli</i>	44
Figura 18. Indução da expressão de <i>Pb01pga7</i> a partir de gene sintético inserido no vetor de expressão pGEX-4T-1.....	45
Figura 19. Testes de padronização da expressão de <i>Pb01pga7</i>	46

Figura 20. Solubilização de <i>Pb01Pga7</i>	47
Figura 21. Extratos de fração 1 (F1) de parede celular e sobrenadantes pós última lavagem com NaCl 0,17 M.....	49
Figura 22. Categorias funcionais e predição de secreção de proteínas reguladas positivamente na presença de hemoglobina, identificadas na F1 de parede celular ..	57
Figura 23. Categorias funcionais e predição de secreção de proteínas reguladas negativamente na presença de hemoglobina, identificadas na F1 de parede celular .	58
Figura 24. Extratos de fração 2 (F2) de parede celular	59
Figura 25. Categorias funcionais e predição de secreção de proteínas reguladas positivamente na presença de hemoglobina, identificadas na F2 de parede celular ..	64
Figura 26. Categorias funcionais e predição de secreção de proteínas reguladas negativamente na presença de hemoglobina, identificadas na F2 de parede celular .	65
Figura 27. Extrato da fração 3 (F3) de parede celular.....	66
Figura 28. Categorias funcionais e predição de secreção de proteínas identificadas na F3 de parede celular.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação de <i>Pb01Pga7</i> (PAAG_02225) por nanoUPLC-MS ^E	46
Tabela 2. Proteínas reguladas positivamente após tratamento de células leveduriformes de <i>P. lutzii</i> com hemoglobina durante 48 horas, identificadas na Fração 1 (F1) de parede celular, extraídas por tratamento com SDS.....	50
Tabela 3. Proteínas reguladas negativamente após tratamento de células leveduriformes de <i>P. lutzii</i> com hemoglobina durante 48 horas, identificadas na Fração 1 (F1) de parede celular, extraídas por tratamento com SDS.....	55
Tabela 4. Proteínas reguladas positivamente após tratamento de células leveduriformes de <i>P. lutzii</i> com hemoglobina durante 48 horas, identificadas na Fração 2 (F2) de parede celular, extraídas por tratamento com NaOH 30 mM	60
Tabela 5. Proteínas reguladas negativamente após tratamento de células leveduriformes de <i>P. lutzii</i> com hemoglobina durante 48 horas, identificadas na Fração 2 (F2) de parede celular, extraídas por tratamento com NaOH 30 mM	63
Tabela 6. Proteínas identificadas na Fração 3 (F3) de parede celular após tratamento de células leveduriformes de <i>P. lutzii</i> com hemoglobina durante 6 horas, extraídas por tratamento com fluoreto hidrogenado (HF) de piridina	67
Tabela 7. Proteínas identificadas preditas como possíveis adesinas.....	72

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Gráficos de qualidade das análises proteômicas referentes à Fração 1 de parede celular de <i>P. lutzii</i> obtida na presença de hemoglobina	95
Anexo 2. Gráficos de qualidade das análises proteômicas referentes à Fração 1 de parede celular de <i>P. lutzii</i> obtida na privação de Fe.....	96
Anexo 3. Gráficos de qualidade das análises proteômicas referentes à Fração 2 de parede celular de <i>P. lutzii</i> obtida na presença de hemoglobina	97
Anexo 4. Gráficos de qualidade das análises proteômicas referentes à Fração 2 de parede celular de <i>P. lutzii</i> obtida na privação de Fe.....	98
Anexo 5. Gráficos de qualidade das análises proteômicas referentes à Fração 3 de parede celular de <i>P. lutzii</i> obtida na presença de hemoglobina	99

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
ACN	Acetonitrila
Als3	<i>Agglutinin-like sequence 3</i> ; sequencia 3 semelhante à aglutinina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain heart infusion</i> ; Infuso de cérebro e coração
BPS	Ácido batofenantrolino disulfônico
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
CaCl₂	Cloreto de Cálcio
DNAc	DNA complementar
CFEM	<i>Common in several fungal extracellular membrane</i> ; Comum em várias membranas extracelulares de fungos
CIG1	<i>Cytokine inducing-glycoprotein</i> ; glicoproteína indutora de citocinas
Csa1	<i>Candida surface antigen 1</i> ; Antígeno 1 de superfície de <i>Candida</i>
Csa2	<i>Candida surface antigen 2</i> ; Antígeno 2 de superfície de <i>Candida</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ESCRT	<i>Endosomal sorting complexe required for transport</i> ; Complexo de distribuição endossomal necessário para transporte
F1	Fração 1 de Parede Celular
F2	Fração 2 de Parede Celular
F3	Fração 3 de Parede Celular
Fe	Ferro
Fe²⁺	Íon ferroso
Fe³⁺	Íon férrico
fmol	Fentomol
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
h	Hora
HF-Piridina	Fluoreto hidrogenado de piridina
IPTG	Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo
KCl	Cloreto de Potássio
kDa	Quilo Dalton
Kg	Quilo
KH₂PO₄	Fosfato de Potássio Monobásico
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro

mM	Milimolar
mm	Milimetro
MMcM	Meio quimicamente definido
Na₂HPO₄	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de Sódio
nanoUPLC-MS^E	Cromatografia líquida de alta resolução, em nano escala, acoplada à espectrometria de massas com aquisição independente de dados
NaOH	Hidróxido de sódio
NH₄HCO₃	Bicarbonato de Amônio
°C	Grau Celsius
<i>P. brasiliensis</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>P. lutzii</i>	<i>Paracoccidioides lutzii</i>
p/v	Peso/volume
<i>Paracoccidioides</i> spp.	Gênero <i>Paracoccidioides</i>
pb	Pares de bases
<i>Pb01</i>	<i>Paracoccidioides lutzii</i> , isolado 01
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCM	Paracoccidioidomicose
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Reação em cadeia da polimerase
Pga7	<i>Predicted GPI-anchored protein 7</i> ; Proteína 7 predita como GPI-ancorada
pH	Potencial hidrogeniônico
PHB	<i>Rabbit Phosphorylase B</i> ; Fosforilase B de Coelho
PLGS	<i>ProteinLynx Global Server</i>
ppm	Parte por milhão
RACC	<i>Rare Codon Calculator</i>
Rbt5	<i>Protein 5 repressed by Tup1</i> ; Proteína 5 reprimida por Tup1
Rbt51	<i>Protein 51 repressed by Tup1</i> ; Proteína 51 reprimida por Tup1
RNA	Ácido Ribonucléico
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
seg	Segundo
<i>SIT1</i>	<i>Siderophore iron transporter</i> ; transportador de sideróforos
TOF	<i>Time of flight</i> ; tempo de voo
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano - Ácido Clorídrico
v/v	Volume/volume
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrometro

RESUMO

O Ferro (Fe) é um metal indispensável para a maioria dos sistemas biológicos e é alvo de competição em interações patógeno-hospedeiro. Em humanos, a maioria do Fe encontra-se complexada ao cofator heme, presente na hemoglobina, uma molécula que é explorada por patógenos como uma fonte de Fe. *Paracoccidioides* spp., um complexo de fungos patogênicos termodimórficos, são agentes etiológicos da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica endêmica na América Latina. *Paracoccidioides* spp. é hábil em utilizar hemoglobina por um processo mediado por receptor (*PbRbt5*). Contudo, evidências experimentais apontam para a existência de um sistema complexo com a presença de outras proteínas. No presente trabalho, foi demonstrada a similaridade de PAAG_02225 (*PbPga7*), de *Paracoccidioides lutzii*, com a sequência do receptor de heme/hemoglobina Pga7 de *Candida albicans*. A expressão heteróloga de *PbPga7* foi realizada em *Escherichia coli*. Devido a presença de códons raros na sequência de *P. lutzii*, comparados aos códons utilizados preferencialmente por *E. coli*, a síntese química do gene foi empregada. A expressão da proteína *PbPga7* abre perspectivas para estudos de caracterização da mesma. Adicionalmente, nanoUPLC-MS^E foi utilizada para analisar o proteoma de parede celular de *P. lutzii*. Observou-se que o tratamento do fungo com hemoglobina promove a regulação positiva de potenciais adesinas e enzimas relacionadas com a defesa contra espécies reativas de oxigênio. Estes dados indicam que estas proteínas podem ser importantes para que o patógeno possa acessar a hemoglobina, aderindo e lisando eritrócitos, além de contrapor a toxicidade gerada pelo heme/hemoglobina liberados, permitindo a captação e utilização dessas moléculas. Os resultados obtidos no presente trabalho reiteram a complexidade do evento de interação entre patógeno e hospedeiro e, adicionalmente, contribuem para a ampliação do entendimento da biologia de *Paracoccidioides* spp.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose; Ferro; nanoUPLC-MS^E; Adesinas; Interações patógeno-hospedeiro.

ABSTRACT

Iron (Fe) is an indispensable metal for most biological systems and is a target of competition in host-pathogen interactions. In humans, most Fe is complexed to the cofactor heme, present in hemoglobin, a molecule that is exploited by pathogens as an iron source. *Paracoccidioides* spp., a complex of thermodynamic pathogenic fungi, are the etiological agents of paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis endemic in Latin America. *Paracoccidioides* spp. are able to use hemoglobin in a receptor(*PbRbt5*)-mediated process. However experimental evidence points to the existence of a complex system with the presence of other proteins. In the present work, we demonstrated the similarity between PAAG_02225 (*PbPga7*), from *Paracoccidioides lutzii*, and the sequence of the heme/hemoglobin receptor *Pga7* from *Candida albicans*, and expressed *PbPga7* in *Escherichia coli*. Due to the presence of rare codons in *P. lutzii* sequence, compared to the codons preferably used by *Escherichia coli*, chemical synthesis of the gene was employed. The expression of *PbPga7* protein opens perspectives for *PbPga7* characterization. In addition, nanoUPLC-MS^E was employed to analyze *P. lutzii* cell wall proteome. We observed that the treatment of fungus with hemoglobin promotes induction of potential adhesins and defense-related enzymes against reactive oxygen species. These data indicate that these proteins may be important for the pathogen to access hemoglobin by adhering and lysing erythrocytes, besides counteracting the toxicity generated by heme/hemoglobin released from erythrocytes, allowing the uptake and use of these molecules. The results obtained in the present work reinforce the complexity of the interaction event between pathogen and host and, in addition, contribute to broaden the understanding of the biology of *Paracoccidioides* spp.

Keywords: Paracoccidioidomycosis; Iron; nanoUPLC-MS^E; Adhesins; Host-pathogen interactions.

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Aspectos gerais

Se conotações fossem utilizadas para descrever o evento de interação patógeno-hospedeiro, certamente as de um cenário de guerra seriam as mais adequadas para tal. Isso deve-se ao fato de que, na literatura, há um número crescente de descobertas de arsenais sofisticados, táticas rebuscadas e de constantes mudanças estratégicas empregadas tanto por patógenos como pelo hospedeiro (CAZA; KRONSTAD, 2013; GONZALEZ; HERNANDEZ, 2016).

Não obstante, a capacidade do hospedeiro controlar o acesso de patógenos a micronutrientes essenciais, chamada de imunidade nutricional, ocupa lugar de destaque nos estudos de interação patógeno-hospedeiro, uma vez que essa habilidade inata afeta de maneira drástica a sobrevivência e consequentemente a proliferação de patógenos (WEINBERG, 1975). Dentre os micronutrientes sob controle do hospedeiro, o Ferro (Fe) é de relevante importância, uma vez que devido à sua flexibilidade de estados de oxidação, está envolvido como cofator de diversas enzimas ou grupo prostético de diversas outras proteínas que atuam em processos como a biossíntese e reparo de DNA, funções antioxidantes, metabolismo energético e transporte de oxigênio, dentre outros (DLOUHY; OUTTEN, 2013). Cabe salientar que a flexibilidade de estados de oxidação do Fe também o confere potencial tóxico, sendo indispensável o estrito controle da biodisponibilidade do metal. Tal controle é feito, em partes, pela ligação do Fe a proteínas como a transferrina, a ferritina, a lactoferrina e à hemoglobina. A hemoglobina consiste em uma proteína tetramérica que contém quatro grupos heme, cada grupo apresentando um íon ferroso, consistindo na principal fonte de Fe no organismo humano. A associação do Fe a proteínas do hospedeiro, além de contrapor a toxicidade do metal, também permite a manutenção da imunidade nutricional (PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2005; TANDARA; SALAMUNIC, 2012; NAIRZ et al., 2014).

Entretanto, patógenos apresentam mecanismos sofisticados para contrapor os desafios impostos pela imunidade nutricional do hospedeiro. Fungos patogênicos empregam estratégias de alta especificidade e afinidade para a captação de Fe, como a capacidade de biossíntese e utilização de sideróforos; a capacidade de absorção de Fe por vias reativas e a capacidade de exploração de proteínas do hospedeiro como fonte de Fe, como a transferrina, a ferritina e especialmente a hemoglobina (ALMEIDA; WILSON;

HUBE, 2009; CAZA; KRONSTAD, 2013). Como exemplo, *Candida albicans*, um importante fungo patogênico é hábil para a utilização de heme/hemoglobina como fonte de Fe, apresentando para tal um importante arsenal de mecanismos coordenados que atuam desde a lise de eritrócitos, células do hospedeiro que contém hemoglobina, até a captação da molécula por uma rede de receptores (Csa2, Rbt5 e Pga7) com posterior processamento em nível intracelular (MOORS et al., 1992; WEISSMAN; KORNITZER, 2004; NASSER et al., 2016).

Dentre os fungos patogênicos cujos mecanismos de captação de Fe têm sido alvos de estudos, os fungos que compõem o gênero *Paracoccidioides* são de relevante importância no contexto de medicina tropical, uma vez que causam uma importante micose sistêmica denominada paracoccidioidomicose (PCM), doença endêmica da América Latina e altamente prevalente em países como o Brasil (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; GONZALEZ; HERNANDEZ, 2016). *Paracoccidioides* spp. também apresenta a capacidade de biossíntese e captação de sideróforos, além de assimilação de Fe por uma via redutiva não-clássica (SILVA et al., 2011; SILVA-BAILÃO et al., 2014; BAILÃO et al., 2015). O fungo ainda apresenta potencial hemolítico e a capacidade de utilizar heme/hemoglobina como fonte de Fe, através de absorção mediada por um receptor denominado *PbRbt5*, presente na parede celular e evidenciado por análises *in silico* como homólogo a um dos receptores de hemoglobina de *C. albicans* (BAILÃO et al., 2014).

Todavia, BAILÃO et al., 2014, verificaram que mutante *knockdown* para *Pbrbt5*, obtido pela estratégia de RNA antisentido, apesar de apresentar virulência reduzida em modelos de infecções de murinos e de macrófagos, ainda apresentava a capacidade de utilizar hemoglobina, resultado sugestivo de que, assim como *C. albicans*, *Paracoccidioides* spp. também apresenta uma rede de receptores envolvidos no processo de captação de hemoglobina. Essa hipótese ainda foi suportada por análises *in silico* que evidenciaram que *Paracoccidioides* spp. também apresenta ortólogos para *csa1* e *csa2*, outros membros da família de receptores de hemoglobina de *C. albicans*, os quais foram regulados positivamente após cultivo do fungo na privação de Fe com posterior adição de hemoglobina ao meio, conforme evidenciado por análises transcricionais.

No presente trabalho, novas análises de homologia foram realizadas e o transcrito de *Paracoccidioides* spp. inicialmente considerado ortólogo de *csa1* passou a ser denominado *Pbpga7*, tendo em vista que este apresenta maior similaridade para com o outro receptor de heme de *C. albicans*, *Pga7*. Dada a importância do entendimento dos

mecanismos que *Paracoccidioides* spp. emprega para a utilização de hemoglobina, no presente trabalho também foi realizada a clonagem e expressão heteróloga de *PbPga7*, além de análise do proteoma de parede celular de *P. lutzii* após cultivo em hemoglobina.

1.2. A importância do Fe para sistemas biológicos

Diversos processos biológicos são baseados em reações de oxirredução, catalisados por uma miríade de enzimas que em muitos casos necessitam de um cofator para que suas corretas atividades biológicas sejam realizadas. Dentre esses cofatores, destaca-se o Fe, devido sua capacidade relevante de atuar tanto como doador ou acceptor de elétrons (DLOUHY; OUTTEN, 2013).

O Fe consiste em um metal de transição e biologicamente apresenta-se nos estados de oxidação ferroso (Fe^{2+}) e férrico (Fe^{3+}), sendo esse último mais comumente encontrado em condições aeróbicas. Cabe salientar que Fe^{3+} é insolúvel em ambiente aquoso e pH fisiológico, o que torna ínfima a biodisponibilidade de Fe livre, fato que corrobora para, dentre outros motivos, o metal apresentar-se complexado a diversas proteínas relacionadas com o transporte (como a transferrina) e o estoque (como a ferritina) do mesmo (PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2005).

O ferro ainda atua como componente estrutural de outras metaloproteínas que não possuem função enzimática, também exercendo papel fundamental para a função proteica. Dentre as diversas metaloproteínas/enzimas que contém Fe, destacam-se algumas envolvidas em processos como o metabolismo energético (aconitase, citocromos), o transporte e estoque de oxigênio (hemoglobina, mioglobina) e sistemas antioxidantes (catalase, peroxidase) (TANDARA; SALAMUNIC, 2012).

Apesar de toda a importância do Fe para sistemas biológicos, as mesmas propriedades que o permitem ser aplicável em diversos processos também o conferem potencial tóxico, devido ao seu poder catalítico para a formação de espécies reativas de oxigênio baseadas nas reações de Fenton e Harber-Weiss, processo que pode resultar no dano oxidativo de ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas e consequentemente prejudicar a homeostasia celular (DLOUHY; OUTTEN, 2013). Uma vez que o Fe é indispensável para a maioria dos organismos, mas, em contrapartida, apresenta potencial tóxico, o estrito controle do metabolismo do metal é imprescindível. O controle da biodisponibilidade do metal ainda é importante no evento de interação patógeno-hospedeiro, uma vez que nesse cenário ocorre competição por Fe, onde o hospedeiro

priva o acesso de patógenos ao metal através da imunidade nutricional, uma habilidade inata e, em contrapartida, patógenos empregam mecanismos para ter acesso ao metal, sendo esses mecanismos atributos de virulência (CASSAT; SKAAR, 2013).

1.3. Potenciais fontes de Fe para patógenos no hospedeiro e imunidade nutricional

Tendo em vista que o Fe livre em sistemas biológicos apresenta baixa solubilidade além de potencial tóxico, o metal encontra-se associado a diversas proteínas (PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2005; TANDARA; SALAMUNIC, 2012). A distribuição do metal em diferentes tecidos no organismo humano adulto é representada na Figura 1.

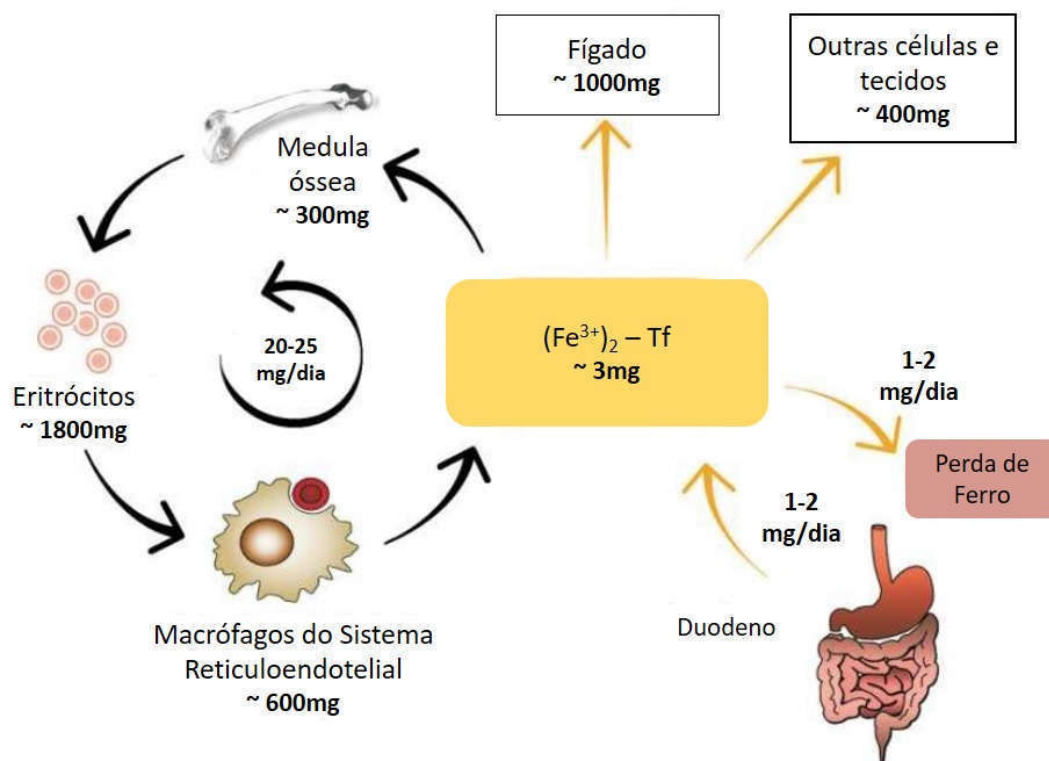


Figura 1. Esquema da distribuição de ferro no organismo humano adulto. Uma vez que a absorção e perda de Fe que ocorrem diariamente se igualam, as demandas celulares pelo metal são supridas pelo remanejamento do mesmo, conforme necessário. Tf: Transferrina. Fonte: (HENTZE; MUCKENTHALER; ANDREWS, 2004).

Em situações fisiológicas, um ser humano adulto apresenta em seu organismo um total de 3-5g de Fe (cerca de 45 mg/Kg em mulheres e de 55 mg/Kg em homens) (PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2005). Alguns órgãos e tecidos como o fígado, os músculos e a medula óssea são ricos em Fe. Em nível intracelular, o Fe é estocado por meio da proteína ferritina, a qual tem a capacidade de albergar número superior a 4000 átomos de Fe. O fígado é um órgão rico em ferritina e, conseqüentemente, rico em Fe (FISCHBACH; ANDEREGG, 1965; PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2005). Nos músculos, a maior quantidade de Fe encontrada deve-se à hemoproteína mioglobina, relacionada com a estocagem de oxigênio (ANDREWS, 1999).

A quantidade de Fe adquirida através da dieta é de 1-2 mg por dia, o que de maneira surpreendente se equipara com a quantidade de Fe que também é perdida diariamente, fato que impõe ao organismo a tarefa de remanejar os estoques do metal para que as diferentes demandas celulares sejam atendidas (PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2005). O tráfego do metal em nível sistêmico é realizado pela transferrina, uma glicoproteína bilobular que apresenta capacidade de ligação a dois Fe^{3+} (AISEN; ENNS; WESSLING-RESNICK, 2001). Outra proteína relacionada à transferrina, denominada lactoferrina, também apresenta a capacidade de ligação a dois Fe^{3+} , porém apresenta maior relevância no contexto de processos infecciosos, onde atua sequestrando Fe nos sítios de infecção (BAKER; BAKER, 2004). O Fe ainda pode ser encontrado associado a diversas outras metaloenzimas/metaloportinas, como citocromos (hemoproteínas), aconitase (proteína com grupo ferro-enxofre), dentre outras (DLOUHY; OUTTEN, 2013).

Apesar da grande variedade de proteínas às quais o Fe pode ser encontrado associado, 60-70% do metal é encontrado complexado ao heme contido na hemoglobina, hemoproteína responsável pelo transporte de oxigênio e albergada por eritrócitos (ANDREWS, 1999; TANDARA; SALAMUNIC, 2012). A hemoglobina apresenta-se como uma proteína tetramérica em que cada tetrâmero apresenta um grupo heme. Cada grupo heme apresenta um Fe^{2+} (PERUTZ et al., 1960; PISHCHANY; SKAAR, 2012). A Figura 2 consiste na representação da estrutura da heme/hemoglobina.

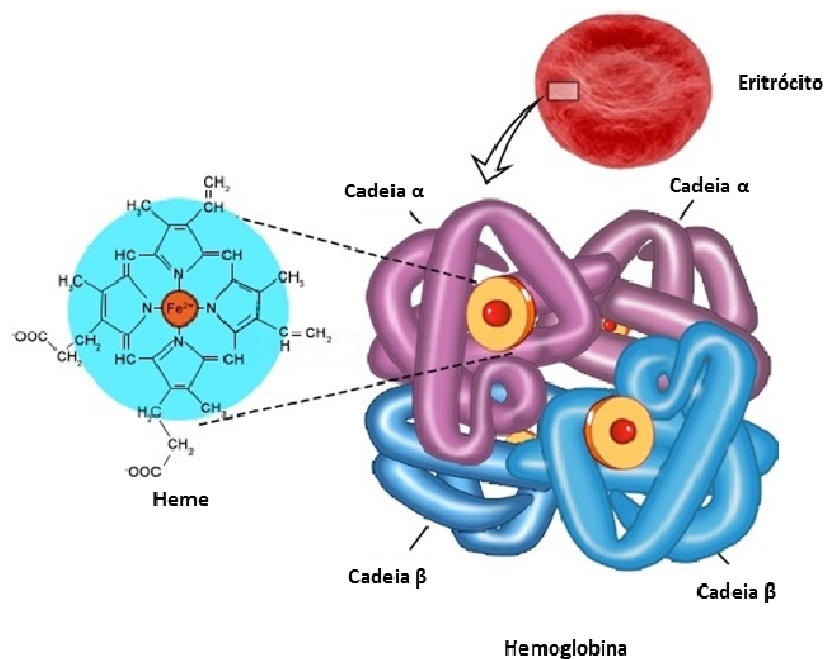


Figura 2. Representação esquemática das moléculas de heme e hemoglobina. A hemoglobina consiste em uma proteína tetramérica. Cada tetrâmero alberga um grupo heme. Cada grupo heme apresenta um Fe^{2+} . Adaptado de <http://www.buzzle.com/articles/structure-of-hemoglobin.html>.

A hemoglobina é sintetizada em células precursoras eritróides, em um processo coordenado também com a biossíntese de heme, o que gera a demanda diária de cerca 20 mg de Fe. Essa quantidade é 10 vezes maior que a obtida diariamente através da dieta, fato que reitera a necessidade do remanejamento dos estoques do metal, o qual deve ser feito de maneira estritamente regulada (TANDARA; SALAMUNIC, 2012). A biossíntese de heme ocorre em uma via com múltiplos passos que promove a obtenção de protoporfirina IX, a partir de modificações enzimáticas do ácido 5-aminolevulínico, obtido por sua vez pela condensação de glicina e succinil-CoA. Após, a protoporfirina IX sofre a inserção de Fe^{2+} , sob ação de uma ferroquelatase mitocondrial, o que gera o grupo heme, o qual é exportado para o citoplasma e inserido na hemoglobina ou outras hemoproteínas (citocromos; mioglobina, nos músculos, dentre outras) (PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2005).

Em caso de lise de eritrócitos, a hemoglobina e o heme são liberados para a circulação e sofrem sequestro por proteínas plasmáticas como a haptoglobina e a hemopexina (ASCENZI et al., 2005). Eritrócitos senis sofrem fagocitose por macrófagos

do sistema recituloendotelial, em um processo no qual a hemoglobina e o heme sofrem processamento e o Fe^{2+} é recuperado e devolvido para o processo de biossíntese de hemoglobina, dentre outras demandas celulares, o que caracteriza um processo de reciclagem do metal e torna os macrófagos detentores de importantes fontes de Fe (PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2005). A Figura 3 consiste numa representação esquemática do metabolismo de heme no organismo humano.

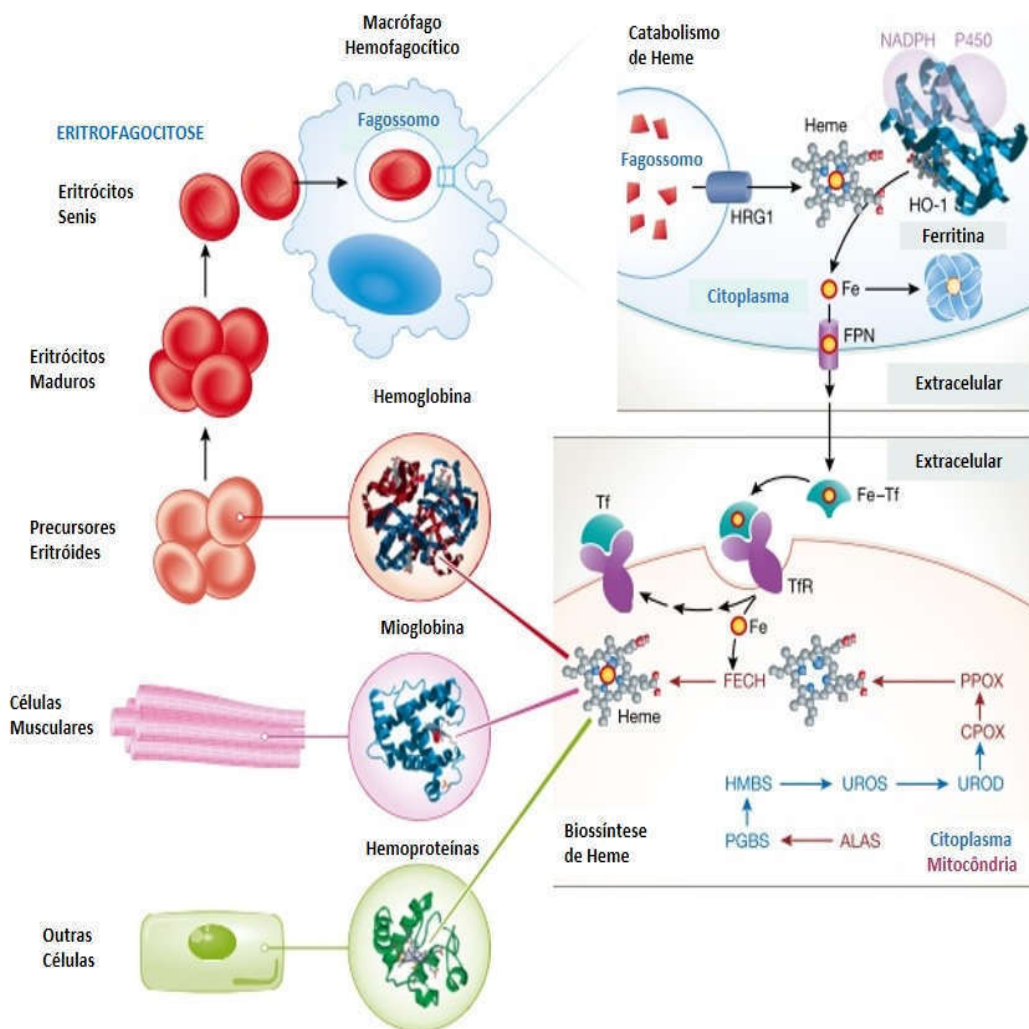


Figura 3. Representação esquemática do metabolismo de heme no organismo humano. Devido às demandas de Fe para a eritropoiese, o estrito controle da biossíntese e catabolismo de heme são necessários. HRG1: gene-1 heme-responsivo. HO1: heme-oxigenase-1. FPN: ferroportina. Tf: transferrina. Tf-R: receptor de transferrina. ALAS: aminolevulinato sintase. PGBS: porfobilinogênio sintase. HMBS: hidroxil-metilbilano sintase. UROS: uroporfirinogênio III co-sintase. UROD: uroporfirinogênio III

descarboxilase. CPOX: coproporfirinogênio oxidase. PPOX: protoporfirina oxidase. FECH: ferroquelatase. Fonte: (SOARES; WEISS, 2015).

A associação do Fe a diferentes proteínas além de ser um mecanismo para contrapor sua toxicidade, também consiste numa estratégia do hospedeiro para limitar o acesso de patógenos ao metal, uma habilidade denominada imunidade nutricional, a qual compõe a imunidade inata (WEINBERG, 1975). O Fe apresenta lugar de destaque no estudo da imunidade nutricional, tendo em vista a complexidade dos mecanismos que atuam para regular o processo de controle da biodisponibilidade do metal (NAIRZ et al., 2014).

Além da ligação do Fe a proteínas específicas, fato que permite o controle da biodisponibilidade do metal em nível extracelular e que conseqüentemente afeta a proliferação de patógenos extracelulares, existem mecanismos atuantes em nível intracelular para controle da biodisponibilidade do metal. Dentre tais mecanismos, a atuação da proteína NRAMP1 (*natural resistance-associated macrophage protein 1*) em macrófagos é bem descrita, a qual permite que os níveis intracelulares de Fe sejam depletados na presença de algum patógeno intracelular, inibindo a sua proliferação (SOARES; WEISS, 2015). Em nível sistêmico, o hormônio hepático denominado hepcidina, é considerado o responsável pela orquestração de todo o processo de regulação da biodisponibilidade de Fe e é regulado positivamente por citocinas produzidas por células que atuam nos eventos iniciais de combate a processos infecciosos (NEMETH et al., 2004).

Apesar de todos os mecanismos envolvidos na imunidade nutricional, as proteínas descritas anteriormente podem ser alvo de exploração por patógenos, sendo para estes fontes de Fe (PISHCHANY; SKAAR, 2012; CASSAT; SKAAR, 2013; CAZA; KRONSTAD, 2013). Mecanismos empregados por fungos patogênicos para a utilização de proteínas do hospedeiro como fonte de Fe têm sido alvos de estudo, uma vez que esses mecanismos consistem em atributos de virulência (CAZA; KRONSTAD, 2013). Detalhes sobre esses mecanismos serão expostos nas sessões subsequentes.

1.4. Mecanismos de captação de Fe por fungos

Assim como para a vasta maioria dos organismos, Fe também é indispensável para fungos, os quais também enfrentam o desafio de obter as quantidades adequadas do metal e ao mesmo tempo contrapor sua toxicidade. Parte substancial do entendimento

sobre os mecanismos que fungos empregam para a captação de Fe é baseada em estudos conduzidos com o fungo não patogênico *Saccharomyces cerevisiae* (VAN HO; WARD; KAPLAN, 2002; KOSMAN, 2003). Elegantes investigações levaram à descoberta de que *S. cerevisiae* apresenta sistemas multienzimáticos que promovem a redução e oxidação de Fe, com posterior transporte do metal para o meio intracelular, sistemas esses que de acordo com a disponibilidade de Fe, podem ser de alta ou baixa afinidade e especificidade para a captação do metal (ASKWITH et al., 1994; DIX et al., 1994; GEORGATSOU; ALEXANDRAKI, 1994; DE SILVA et al., 1995; STEARMAN et al., 1996; DIX; BRIDGHAM; BRODERIUS, 1997).

Sistemas de baixa afinidade e especificidade para a captação de Fe atuam quando a disponibilidade do metal no meio apresenta-se em quantidades satisfatórias para o fungo (VAN HO; WARD; KAPLAN, 2002). Entretanto, quando no hospedeiro, fungos patogênicos são desafiados por um ambiente hostil no qual, dentre outras situações, enfrentam a privação de Fe promovida pela imunidade nutricional e, frente a isso, empregam sistemas de alta afinidade e especificidade para a captação de Fe, os quais consistem em: assimilação redutiva de ferro; captação de Fe mediada por sideróforos e absorção e degradação de heme (CAZA; KRONSTAD, 2013; HAAS, 2014).

1.4.1. Assimilação redutiva de Fe por fungos patogênicos

A exemplo do sistema multienzimático de alta afinidade e especificidade para a captação de Fe empregado por *S. cerevisiae*, alguns fungos patogênicos apresentam sistemas similares. *C. albicans*, um importante fungo com potencial patogênico, apresenta um sistema composto por redutases férricas, que promovem a redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} , o qual sofre nova oxidação por oxidases dependentes de cobre e após é absorvido por ferro-permeases, que atuam de maneira conjunta e caracterizam o evento de assimilação redutiva de Fe (ALMEIDA; WILSON; HUBE, 2009). Através desse sistema, *C. albicans* é hábil para utilizar ferritina, com o auxílio de um receptor denominado Als3 (*agglutinin-like sequence*), além de transferrina como fontes de Fe, consistindo em um importante atributo de virulência (KNIGHT et al., 2005; ALMEIDA et al., 2008).

Aspergillus fumigatus, outro fungo patogênico de relevante importância, também apresenta a capacidade de assimilação de Fe por via redutiva. Entretanto, o sistema não se mostrou relevante como fator de virulência para o fungo, uma vez que mutante para ferro-permease (um dos componentes do sistema) não apresentou virulência reduzida quando empregado em ensaios de infecção de camundongos (SCHRETTL et al., 2004).

Estudo com foco na resposta transcricional do importante fungo patogênico *Cryptococcus neoformans* à privação de Fe foi hábil para identificar a regulação positiva da expressão de um gene que codifica para ferro-permease, o que foi sugestivo de que uma via redutiva de assimilação de Fe seria presente no fungo. O achado foi então validado por ensaios de crescimento de mutante para o gene em meio pobre em Fe, os quais demonstraram importante retardo no crescimento (LIAN et al., 2005). Estudos subsequentes ainda corroboraram para a elucidação do processo, em que o mutante apresentou virulência reduzida em infecção de murinos e teve a capacidade de utilizar transferrina reduzida, fatos que demonstraram a importância do sistema para o sucesso do patógeno no estabelecimento da infecção (JUNG et al., 2008).

1.4.2. Biossíntese e captação de sideróforos por fungos patogênicos

Alguns fungos patogênicos são hábeis para a biossíntese de sideróforos, moléculas que consistem em ligantes de baixo peso molecular com alta especificidade por Fe^{3+} , características que conferem aos sideróforos funções de sequestro, transporte e inclusive estoque de Fe (NEILANDS, 1993). Dentre os fungos que detêm a capacidade de biossíntese e captação de sideróforos, *A. fumigatus* é o que apresenta o evento melhor compreendido, consistindo em um importante atributo de virulência para o patógeno (SCHRETTL et al., 2004; HAAS, 2014).

Na maioria dos casos, sideróforos sintetizados por fungos são do tipo hidroxamato (bactérias podem sintetizar sideróforos que apresentam outras naturezas químicas), o que ocorre através de sucessivas transformações enzimáticas da ornitina, um aminoácido não proteínogênico (HAAS; EISENDLE; TURGEON, 2008). *A. fumigatus* sintetiza e secreta sideróforos, os quais atuam no meio extracelular sequestrando Fe^{3+} e, após, são absorvidos para o meio intracelular através de transportadores específicos, sofrendo subsequente ação de uma esterase, para a liberação de Fe^{3+} (KRAGL et al., 2007; HAAS; EISENDLE; TURGEON, 2008).

C. neoformans não apresenta a capacidade de sintetizar sideróforos. Entretanto, o fungo é hábil para a utilização de sideróforos produzidos por outros organismos (xenosideróforos) em um processo também dependente de transportadores (TANGEN et al., 2007; JUNG; KRONSTAD, 2008). Fato interessante é que, ao contrário de *A. fumigatus*, a utilização de sideróforos não é de relevante importância para a virulência do patógeno, isso porque mutante nulo para *SIT1* (*siderophore iron transporter*) não apresentou redução da virulência em modelos murinos de infecção.

Apesar de evidências experimentais da produção de sideróforos por *C. albicans*, o evento ainda permanece incerto na literatura, uma vez que genes importantes envolvidos com os eventos iniciais do processo biossintético de sideróforos não foram encontrados no genoma do fungo (HOLZBERG; ARTIS, 1983; ISMAIL; BEDELL; LUPAN, 1985; HAAS, 2003). Entretanto, *C. albicans* também é hábil para a utilização de xenosideróforos, por um processo mediado por um transportador específico que consiste em um importante fator de virulência no processo de invasão epitelial, mas é dispensável na infecção sistêmica, uma vez que outros mecanismos para captação de Fe, como a captação de heme, podem ser empregados pelo fungo (HEYMANN et al., 2002).

1.4.3. Captação de heme por fungos patogênicos

Uma vez que a maior quantidade de Fe no organismo humano é encontrada complexada ao heme/hemoglobina, a capacidade de fungos patogênicos utilizarem heme/hemoglobina constitui um importante atributo de virulência e os mecanismos responsáveis por tal capacidade também têm sido alvos de estudos (CAZA; KRONSTAD, 2013).

Como exemplo, o fungo patogênico termodimórfico *Histoplasma capsulatum* é hábil na utilização de hemina (a forma oxidada do heme) e hemoglobina como fontes de Fe, em um processo possivelmente dependente de alguma adesina ou receptor, devido ao fato de o tratamento da superfície celular do patógeno com proteinase abolir essa capacidade. Entretanto, estudos adicionais ainda não foram realizados para a caracterização do evento em nível molecular (FOSTER, 2002).

C. neoformans também é hábil na utilização de heme/hemoglobina, através de uma glicoproteína extracelular denominada CIG1 (*cytokine inducing-glycoprotein*), cujo transcrito é altamente induzido em condições de privação de Fe (CADIEUX et al., 2013). O fungo ainda apresenta a capacidade de hidrolisar hemoglobina, através de uma serino proteinase secretada (YOO JI et al., 2004). A absorção de heme por *C. neoformans* ocorre por meio do sistema ESCRT (*endosomal sorting complexe required for transport*), uma vez que mutações em componentes do sistema levam à diminuição da capacidade do fungo crescer na presença de heme como única fonte de Fe (HU et al., 2013; GUANGGAN et al., 2015).

C. albicans também tem sido alvo de estudos quanto aos mecanismos de utilização de hemoglobina como fonte de Fe, cujo processo é o melhor caracterizado até o momento. A hemoglobina é utilizada preferencialmente pelas pseudohifas do patógeno,

produzidas durante o processo infectivo, sendo a hemoglobina também indutora da diferenciação do patógeno (TANAKA et al., 1997; PENDRAK; ROBERTS, 2007). *C. albicans* apresenta a capacidade de se ligar a eritrócitos e também produz um fator hemolítico, caracterizado como uma manoproteína cuja porção glicídica é responsável por promover a lise de eritrócitos (MOORS et al., 1992; MANNS; MOSSER; BUCKLEY, 1994; WATANABE et al., 1999).

A absorção de heme por *C. albicans* ocorre através de receptores, que inicialmente foram descritos como componentes de uma família (as quais seriam as proteínas Rbt5, Rbt51, Csa1, Csa2 e Pga7), apresentando como característica comum a presença do domínio denominado CFEM (WEISSMAN; KORNITZER, 2004). O domínio CFEM (*common in several fungal extracellular membrane*) apresenta como característica notável a presença de oito resíduos de cisteína com espaçamentos conservados entre eles (KULKARNI; KELKAR; DEAN, 2003). Trabalho recente de NASSER et al., 2016, demonstrou por estudo de cristalografia de Csa2, que o domínio é responsável pela função de captação do heme e que um resíduo aspártico conservado no domínio é indispensável para o processo. Cabe salientar que o domínio CFEM é encontrado apenas em proteínas de fungos e que, surpreendentemente, fungos patogênicos apresentam um maior número de proteínas com o domínio, o que o posiciona como um potencial alvo para estudos que visem a elucidação de mecanismos de virulência (ZHANG et al., 2015).

Em estudos iniciais, apenas a manoproteína GPI-ancorada Rbt5 (*repressed by Tup1*) foi apontada como indispensável para o processo de utilização de heme por *C. albicans*, apesar de uma proteína relacionada, Rbt51, ter conferido a habilidade de utilização de hemoglobina à *S. cerevisiae*. Rbt5 ainda foi fortemente induzida na privação de Fe (WEISSMAN; KORNITZER, 2004). Csa1 (*Candida surface antigen 1*), apesar de ter sido induzida quando o fungo foi cultivado na privação de Fe, não teve função relacionada com a captação de heme, estando envolvida juntamente com Rbt51 em processos de formação de biofilme, conforme apontado por estudos subsequentes (WEISSMAN; KORNITZER, 2004; PÉREZ et al., 2006, 2011; SORGO et al., 2013; MARTÍNEZ et al., 2016).

Não obstante, outra proteína denominada Csa2 (*Candida surface antigen 2*) foi identificada no secretoma de *C. albicans* sob privação de Fe e foi demonstrado por evidências experimentais que a proteína é importante para o processo de utilização de hemoglobina, uma vez que mutantes nulos para *csa2* apresentam menor capacidade para

tal (SORGO et al., 2010; OKAMOTO-SHIBAYAMA et al., 2014). Em estudo subsequente, relevante investigação conduzida por KUZNETS et al., 2014, demonstrou que Rbt5 não atua isoladamente no processo de captação de heme liberado da hemoglobina, mas sim, atua conjuntamente com Pga7 (*predicted GPI-anchored*), outra proteína GPI-ancorada, em um processo estritamente coordenado.

As proteínas Rbt5 e Pga7 encontram-se distribuídas em diferentes localizações na parede celular e membrana do patógeno, levando à passagem de heme de uma proteína para outra, numa rede de distribuição, o que permite a internalização do mesmo. Apesar de menos abundante que Rbt5, Pga7 apresenta maior importância para o processo, uma vez que mutantes nulos para *pga7* tiveram a capacidade de utilizar hemoglobina afetada de maneira mais severa que mutantes nulos para *rbt5*. Mutante para *pga7* ainda apresentou virulência reduzida quando utilizado para a infecção de camundongos, o que destaca Pga7 como importante fator de virulência (KUZNETS et al., 2014).

A rede de receptores, Rbt5 e Pga7, além de Csa2, que atua como hemóforo, permite a passagem de heme pela parede celular do fungo, sendo este após internalizado por um processo dependente do sistema ESCRT, similar ao que ocorre em *C. neoformans* (WEISSMAN et al., 2008). Após internalização do heme, o mesmo sofre ação da enzima heme-oxigenase, o que promove a liberação do Fe (PENDRAK et al., 2004). A Figura 4 consiste na representação esquemática do evento de captação de heme por *C. albicans*.

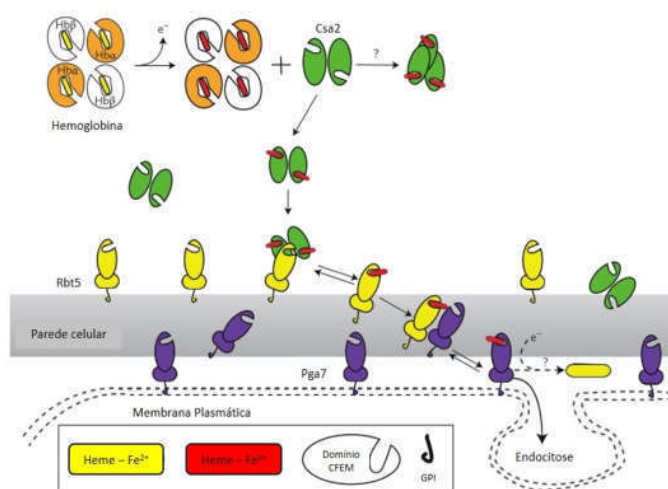


Figura 4. Representação esquemática do evento de captação de heme por *C. albicans*. O processo ocorre por uma rede de receptores que contém o domínio CFEM, responsável pela ligação ao heme. Os receptores formam uma rede transmissão, que permitem a passagem de heme pela parede celular. Csa2: *Candida surface antigen 2*. Rbt5: *Repressed by Tup1*. Pga7: *Predicted GPI-anchored*. CFEM: *common in several fungal extracellular membrane*. GPI: glicosilfosfatidilinositol. Fonte: (NASSER et al., 2016).

1.5. O gênero *Paracoccidioides*: aspectos gerais e filogenia

O gênero *Paracoccidioides* agrupa fungos patogênicos termodimórficos de relevante importância no contexto de medicina tropical, uma vez que causam uma grave micose sistêmica endêmica da América Latina, com alta prevalência no Brasil, denominada paracoccidioidomicose (PCM) (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; GONZALEZ; HERNANDEZ, 2016). O primeiro relato do fungo data de 1908, por trabalho pioneiro realizado por Adolpho Lutz. Alfonso Splendore, em trabalho subsequente, com data de 1911, sugeriu a denominação de *Zymonema brasiliense* para o agente etiológico da até então chamada “nova hifoblastomicose americana”. No entanto, foi Floriano de Almeida, em trabalho publicado em 1930, quem propôs a denominação de *Paracoccidioides brasiliensis* (LACAZ, 1994).

Paracoccidioides spp. apresenta dimorfismo dependente de temperatura. A 37°C, o fungo comporta-se como levedura, apresentando ao nível macroscópico aspecto cerebriforme e colônias com coloração creme e, microscopicamente, apresenta a aparência marcante de uma “roda de leme”, devido a presença de múltiplos brotamentos que circundam células maduras. Quando submetido a temperaturas em torno de 26°C, o fungo comporta-se como micélio e apresenta-se macroscopicamente como colônias pequenas e irregulares; microscopicamente apresenta hifas septadas (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; GONZALEZ; HERNANDEZ, 2016). Os aspectos macroscópicos das fases miceliana e leveduriforme estão representados na Figura 5.

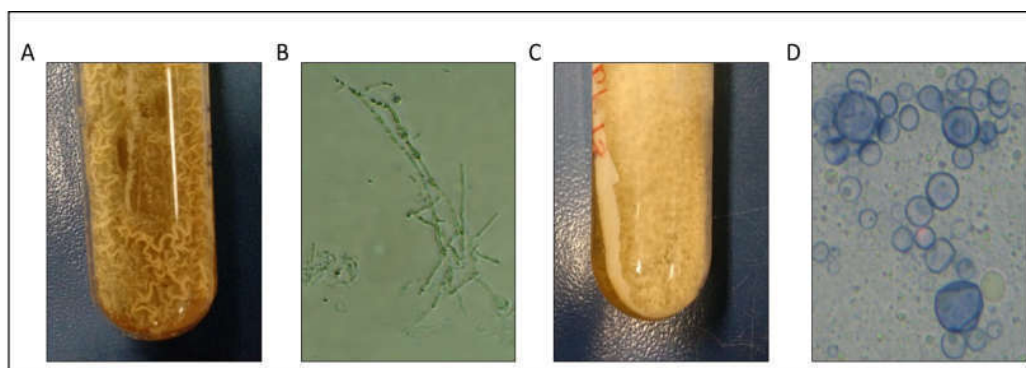


Figura 5. Aspectos macro e microscópicos das fases miceliana e leveduriforme de *Paracoccidioides* spp. **A:** aspecto macroscópico da fase miceliana, cultivada a 26 °C. **B:** aspecto microscópico da fase miceliana, cultivada a 26 °C. Aumento de 400 x **C:** aspecto macroscópico da fase leveduriforme, cultivada a 37 °C. **D:** aspecto microscópico da fase leveduriforme, cultivada a 37 °C. Aumento de 1000 x. Fonte: Laboratório de Biologia Molecular – Universidade Federal de Goiás.

O gênero *Paracoccidioides* é agrupado ao filo Ascomycota, classe Euromycetes, ordem Onygenales e família Ajellomycetaceae (Onygenaceae) (UNTEREINER et al., 2004; BAGAGLI et al., 2008). A literatura considerava a existência de apenas uma espécie no gênero *Paracoccidioides*: a espécie *P. brasiliensis*. Entretanto, estudos de filogenia evidenciaram que *P. brasiliensis* alberga diferentes espécies filogenéticas (MATUTE et al., 2006). Teixeira et al., 2009, em trabalho de relevante importância, realizaram novas análises de filogenia no gênero *Paracoccidioides* que culminaram na proposição de uma nova espécie: *Paracoccidioides lutzii*. Tal achado corroborou com os resultados de estudo pioneiro conduzido por Soares et al., 1995, que demonstraram que Pb01 (o principal isolado representante de *P. lutzii*), quando submetido a análises de amplificação randômica de DNA, apresenta perfil de amplificação diferente de outros isolados também investigados no estudo. A visão atual na literatura quanto ao gênero *Paracoccidioides* é a de que este é composto pelas espécies *P. brasiliensis* (por sua vez composta pelas espécies filogenéticas S1a, S1b, PS2, PS3 e PS4) e *P. lutzii*, conforme estudos subsequentes realizados que agregaram novas informações importantes quanto à filogenia em *Paracoccidioides* spp. Além disso, ambas as espécies são capazes de causar PCM (TEIXEIRA et al., 2014; MUÑOZ et al., 2016).

A determinação do habitat de *Paracoccidioides* spp., apesar de alvo de diversos estudos, ainda continua obscura na literatura (RESTREPO, 1985; RESTREPO; MCEWEN; CASTAÑEDA, 2001). Não obstante, devido a identificação do fungo em amostras oriundas do solo, é aceito que o fungo apresenta um ciclo de vida, atuando no solo como saprófita e, quando em contato com o hospedeiro, estabelecendo relação de parasitismo (BAGAGLI et al., 2008).

1.5.1. Paracoccidioidomicose: aspectos clínicos e epidemiológicos

A infecção por *Paracoccidioides* spp. ocorre quando o indivíduo inala conídios ou fragmentos de micélio do fungo. Nos pulmões, sob ação da temperatura do hospedeiro, o fungo sofre transição para a forma de levedura, responsável por estabelecer parasitismo (SAN-BLAS, 1993). A infecção pode ser controlada pelo sistema imune inato do hospedeiro ou disseminar para outros órgãos e tecidos por via linfática ou hematogênica, provocando manifestações graves, além de poder levar indivíduos afetados à morte (MACKINNON, 1959; BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; GONZALEZ; HERNANDEZ, 2016).

O contato do indivíduo com as formas infectivas do fungo não significa necessariamente o estabelecimento da doença, de forma que a PCM é classificada clinicamente como PCM infecção (ou subclínica) e PCM doença. De acordo com as manifestações, a PCM doença pode ser ainda classificada como apresentando-se de forma aguda/subaguda (cerca de 5% dos casos, acomete indivíduos até 35 anos de idade) ou crônica (mais de 90% dos casos, afeta indivíduos principalmente com idades entre 30 e 60 anos). De acordo com a quantidade de órgãos e tecidos afetados pela doença, a PCM ainda é classificada como unifocal ou multifocal. A presença de formas residuais ou sequelares também é considerada (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; MARQUES, 2012). A Figura 6 contém exemplos de lesões provocadas pela PCM.



Figura 6. Lesões provocadas pela paracoccidioidomicose em diferentes formas clínicas. Diferentes formas clínicas da doença podem apresentar graves manifestações, além de deixar sequelas **A:** fase aguda. **B:** fase crônica. **C:** lesão sequelar. Adaptado de (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

O diagnóstico de PCM é baseado no achado de *Paracoccidioides* spp. em espécimes clínicos como escarro, raspado de lesão, aspirado de linfonodos, além de fragmentos de biopsias oriundos de órgãos e tecidos sob suspeita de acometimento pela doença (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; MARQUES, 2012). A sorologia pode ser empregada tanto para fins diagnósticos como para acompanhamento do quadro do paciente, uma vez que importantes avanços na área de imunodiagnóstico da PCM permitiram atingir alta sensibilidade e especificidade nos testes empregados (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2014). O tratamento de indivíduos acometidos por PCM depende da severidade das manifestações da doença, sendo que para casos moderados, geralmente são empregados itraconazol ou sulfametoxazol em associação com trimetoprim. Para casos graves, o uso de anfotericina B é recomendado. Voriconazol também pode ser empregado no tratamento. O tempo de tratamento da PCM é longo, podendo chegar a até 2 anos, o que aponta para a necessidade do desenvolvimento de novos antifúngicos que sejam mais efetivos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; MARQUES, 2012).

A PCM é uma doença endêmica da América Latina, com alta prevalência no Brasil, conforme evidenciado pela Figura 7. A doença afeta principalmente indivíduos do sexo masculino que trabalham com o manejo do solo. Entretanto, por não ser uma doença de notificação compulsória, há a dificuldade para a construção do verdadeiro cenário da doença, no que tange à quantidade de indivíduos afetados. Apesar da falta de disponibilidade de informações, inquéritos epidemiológicos sugerem que cerca de 10 milhões de indivíduos já tiveram contato com o patógeno, fato preocupante se for considerado que alguma parcela desses indivíduos pode vir a desenvolver a doença (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; GONZALEZ; HERNANDEZ, 2016). Prado et al., 2009, publicaram um estudo em que apontaram a PCM como a principal causa de morte por micoses sistêmicas no Brasil entre os anos de 1996 e 2006. Relatos de caso de PCM em países fora da região de endemicidade alertam para a importância da doença, que muitas vezes é confundida com outras doenças com acometimento pulmonar, como a tuberculose, levando ao retardo do devido manejo terapêutico, como um caso recentemente descrito na Áustria (WAGNER et al., 2016).

Tendo em vista a gravidade das manifestações da PCM e a necessidade de aprimoramento do tratamento da doença, estudos com foco nos mecanismos empregados por *Paracoccidioides* spp. quando no hospedeiro são de relevante importância, pois podem culminar no advento de novos alvos para terapia e diagnóstico diferencial da doença.

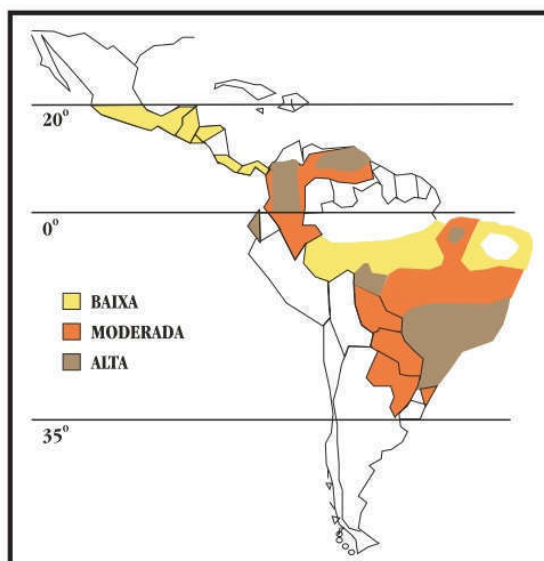


Figura 7. Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose com base na prevalência da doença em diferentes regiões. A PCM é uma micose sistêmica endêmica da América Latina, com alta prevalência no Brasil. Fonte: (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

1.6. Captação de Fe por *Paracoccidioides* spp.

O acesso de *Paracoccidioides* spp. ao Fe é indispensável para o sucesso deste no evento de interação patógeno-hospedeiro. Como exemplo, ensaios de fagocitose do fungo por macrófagos e monócitos tratados com deferoxamina, um quelante de Fe que atua em nível intracelular, a sobrevivência do fungo foi drasticamente afetada, inibindo inclusive a transição dimórfica de conídios para levedura, evento central para o estabelecimento da infecção, o que reitera a importância do metal para o patógeno (CANO et al., 1994; DIAS-MELICIO et al., 2005).

Paracoccidioides spp. é capaz de causar doença, o que indica que o patógeno apresenta mecanismos para, dentre outros desafios, contrapor a privação de Fe enfrentada no hospedeiro, imposta pela imunidade nutricional, fato que motivou alguns estudos que têm contribuído para a elucidação desses mecanismos. A importância do Fe para *Paracoccidioides* spp. foi reiterada por estudo com abordagem em proteômica que demonstrou que quando o fungo é submetido à privação do metal, ocorrem drásticas mudanças no estado metabólico do patógeno, que passa a utilizar para a produção de energia preferencialmente vias que não dependem de Fe, como a via glicolítica, como forma de direcionar o metal apenas para processos indispensáveis (PARENTE et al., 2011).

Estudo pioneiro para a investigação dos mecanismos empregados por *Paracoccidioides* spp. para a captação de Fe, conduzido por SILVA et al., 2011, evidenciou através de extensivas análises *in silico* que o patógeno apresenta diversos ortólogos para com genes de *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *A. fumigatus* envolvidos nos sistemas de assimilação redutiva de Fe, além de biossíntese e captação de sideróforos. As evidências obtidas por SILVA et al., 2011, quanto à habilidade de *Paracoccidioides* spp. para a biossíntese de sideróforos corroboraram com trabalhos que já haviam levantado essa hipótese, em investigações do crescimento do fungo (ARANGO; RESTREPO, 1988; CASTANEDA et al., 1988). Todavia, a confirmação de que *Paracoccidioides* spp. é hábil para a biossíntese de sideróforos foi realizada por trabalho de SILVA-BAILÃO et al., 2014, que demonstraram através de ensaios elegantes e abordagens sofisticadas que o fungo produz sideróforos do tipo hidroxamato e que também é capaz de realizar absorção inclusive de xenosideróforos.

BAILÃO et al., 2015, investigaram a via redutiva de assimilação de Fe de *Paracoccidioides* spp. Conforme citado em sessões anteriores, vias redutivas de

assimilação de Fe consistem em sistemas multienzimáticos e que culminam na atividade de uma ferro-permease. Entretanto, Silva et al., 2011, demonstraram por investigações *in silico* que o fungo não apresenta genes ortólogos que codificam para ferro-permeases. Frente a esse fato, Bailão et al., 2015, demonstraram a atividade de uma via redutiva de assimilação de Fe em *Paracoccidioides* spp., porém sugeriram que a ausência de ferro-permease seria compensada pela atividade promíscua de zinco-permeases, as quais são reguladas positivamente quando na privação de Fe e poderiam transportar o metal, caracterizando dessa forma uma via redutiva não-clássica de assimilação de Fe.

Bailão et al., 2014, em estudo para a verificação de fontes de Fe do hospedeiro que poderiam ser utilizadas por *Paracoccidioides* spp., demonstraram que apesar de ser hábil para a utilização de ferritina, transferrina e lactoferrina, o fungo utiliza preferencialmente hemoglobina como fonte de Fe. Os autores demonstraram ainda, através de análises *in silico*, que o fungo apresenta ortólogos para *rbt5*, *rbt51*, *csa1* e *csa2*, componentes da família de receptores de heme de *C. albicans*, os quais detinham características conservadas como a presença de domínio CFEM, peptídeo sinal e sítios para a adição de âncora de GPI. Os autores, na ocasião, não encontraram ortólogos no genoma de *Paracoccidioides* spp. para com *pga7* de *C. albicans*, cujo produto é de extrema importância para o processo de captação de heme.

Análises transcricionais dos ortólogos de *rbt5*, *csa1* e *csa2* em *P. lutzii* (isolado Pb01) após cultivo do fungo na presença de hemoglobina, mostraram que os transcritos são regulados positivamente, sendo o transcrito de *rbt5* o mais fortemente regulado. Os autores seguiram, então, com a caracterização de Pb01Rbt5 e demonstraram que a proteína está presente na parede celular e é ancorada a esta por GPI, além de ser capaz de se ligar à hemina/hemoglobina. Visando a elucidação de maneira mais abrangente do processo, os autores ainda obtiveram mutante *knockdown* para *rbt5* através da estratégia de RNA antisentido e promoveram ensaios fenotípicos e de sobrevivência do mutante. Apesar de o mutante ter apresentado menor sobrevivência quando recuperado após infecção de macrófagos e de camundongos, o fungo ainda apresentou a capacidade de crescer na presença de hemoglobina. Tal fato é sugestivo de que assim como descrito para *C. albicans*, outras proteínas podem atuar em conjunto com Rbt5 para a utilização de heme/hemoglobina, o que ainda é suportado pela presença de outros ortólogos para com a família de receptores de *C. albicans* no genoma de *Paracoccidioides* spp (BAILÃO et al., 2014). Diante do exposto, a caracterização dos outros prováveis receptores de heme em *Paracoccidioides* spp. ainda precisa ser realizada, uma vez que

lacunas sobre a citolocalização destes além da capacidade de ligação à hemina/hemoglobina ainda precisam ser preenchidas.

A Figura 8 consiste em uma representação dos mecanismos propostos para a captação de Fe empregados por *Paracoccidioides* spp.

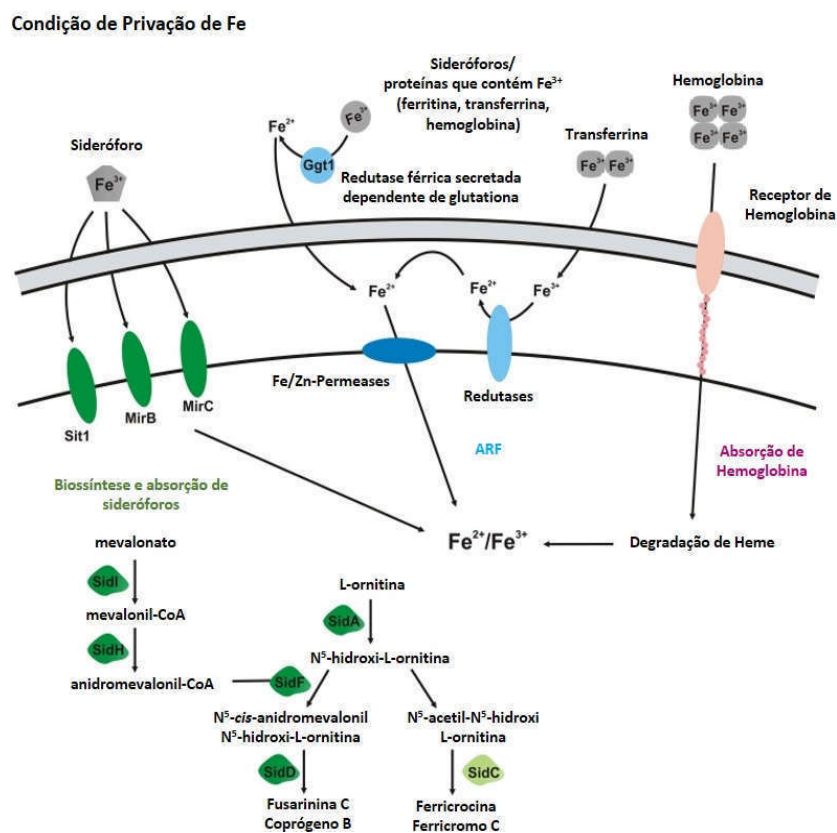


Figura 8. Mecanismos de captação de ferro em *Paracoccidioides* spp. Sit1, MirB e MirC: transportadores de sideróforos. SidA, SidC, SidD, SidF, SidH e SidI: enzimas envolvidas nas vias de biossíntese de sideróforos. Ggt1: gama-glutamil transferase 1. ARF: assimilação redutiva de ferro. Adaptado de Bailão et al., (2015).

1.7. Parede celular de *Paracoccidioides* spp.

A parede celular de fungos consiste em uma estrutura complexa composta por redes de glicopolímeros onde proteínas encontram-se retidas por ligações covalentes, não-covalentes ou pontes dissulfeto. Proteínas também podem encontrar-se ancoradas à parede celular através de glicosilfosfatidilinositol (KLIS; DE GROOT; HELLINGWERF, 2001; PITARCH et al., 2002). Proteínas são direcionadas para a parede celular através de uma via clássica de secreção, que é dependente de um peptídeo sinal na porção N-terminal da proteína ou, através de vias não clássicas de secreção, as quais podem variar desde eventos de translocação até a mecanismos ainda não compreendidos integralmente (NOMBELA; GIL; CHAFFIN, 2006).

Uma vez que a parede celular consiste na interface de contato do patógeno para com o hospedeiro, o estudo da estrutura e suas implicações em mecanismos de virulência são de relevante importância e, ao mesmo tempo, desafiador, tendo em vista a complexidade envolvida no processo de fracionamento de seus componentes, indispensável para a realização de investigações (PITARCH; NOMBELA; GIL, 2008). A Figura 9 apresenta uma representação esquemática da organização geral da parede celular de fungos.

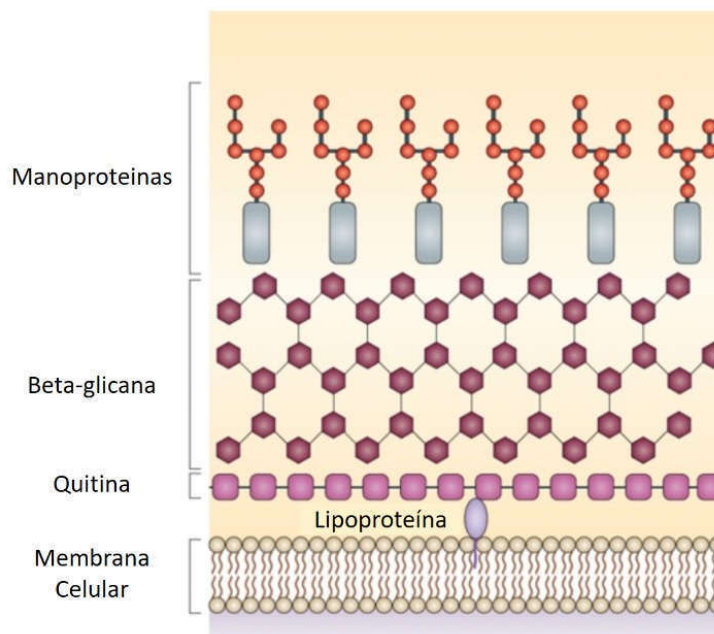


Figura 9. Representação esquemática da organização geral da parede celular de fungos. Uma intrincada rede de glicopolímeros na qual proteínas são associadas compõe a parede celular. Em fungos patogênicos, a parede celular apresenta diversas implicações no que tange a atributos de virulência. Adaptado de BROWN et al., 2015.

Estudos visando elucidar a composição química da parede celular de *Paracoccidioides* spp. demonstraram que a natureza dos glicopolímeros presentes nas fases de micélio e levedura sofre mudança. Apesar da presença de quitina em ambas as formas, a presença de beta-1,3-glicana é predominante na fase de micélio, enquanto que alfa-1,3 e alfa-1,6-glicanas são predominantes na fase de levedura, fato que representa importantes implicações na virulência do patógeno (KANETSUNA; CARBONELL, 1970; KANETSUNA et al., 1972; BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993).

Informações sobre a composição proteica da parede celular de *Paracoccidioides* spp. ainda são escassas. No entanto, estudo baseado no transcrito do patógeno levou a inferências sobre a maquinaria do fungo responsável pela biossíntese e remodelamento da parede celular, sugerindo a presença de diversas enzimas associadas à parede celular relacionadas com o processo (TOMAZETT et al., 2005). As proposições de Tomazett et al., 2005, foram, em parte, confirmadas por trabalho posterior em que a caracterização de uma família de beta-1,3-glicosiltransferases foi realizada, com a confirmação da localização dessas enzimas na parede celular (DE SOUSA LIMA et al., 2012).

Diversos estudos com foco na identificação de atributos de virulência de *Paracoccidioides* spp. têm demonstrado a presença de outras enzimas na parede celular com função de adesinas, apesar de várias dessas estarem classicamente envolvidas em vias metabólicas em nível intracelular, como malato sintase e triosefosfato isomerase, o que demonstra a ocorrência de proteínas bi ou multifuncionais (PEREIRA et al., 2007; DA SILVA NETO et al., 2009). Outra enzima com função conhecida, aconitase, também foi encontrada na parede celular em estudos de citolocalização (BRITO et al., 2011). Conforme descrito anteriormente, Rbt5, um receptor de heme/hemoglobina, também teve sua localização estabelecida na parede celular (BAILÃO et al., 2014).

Longo et al., 2014, realizaram análise do proteoma de parede celular de diferentes isolados (*Pb03* e *Pb18*) de *P. brasiliensis*, através de extratos obtidos das formas de levedura e micélio, com resultados que corroboraram a complexidade da organização da parede celular do patógeno. Entretanto, os autores não realizaram tratamentos diferenciais para a obtenção de proteínas associadas à parede celular por diferentes tipos de interação, uma vez que realizaram tratamento apenas com um agente redutor (DTT – ditioneitol), o que pode ter impedido a identificação de proteínas de maneira mais abrangente. Além disso, os autores obtiveram extratos de parede celular a partir de cultivo do fungo em condições não estressoras, o que pode ter limitado a identificação de importantes proteínas relacionadas com o processo de interação com o hospedeiro.

Estudos mais abrangentes, como análises em larga escala do proteoma da parede celular, em condições que mimetizem as encontradas pelo patógeno quando no hospedeiro, podem promover a descoberta de novas proteínas envolvidas no processo de interação com o hospedeiro. Essa abordagem pode, inclusive, contribuir para a elucidação dos mecanismos de utilização de heme/hemoglobina por *Paracoccidioides* spp., tendo em vista que além de *PbRbt5*, outras proteínas presentes na parede celular possivelmente podem atuar conjuntamente no processo, conforme descrito para *C. albicans* (KUZNETS et al., 2014; NASSER et al., 2016).