

Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Análise da Expressão de Genes Envolvidos na
Manutenção da Homeostase de Cobre no
Patógeno Humano *Paracoccidioides brasiliensis*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Candidato: Rodrigo da Silva Santos

Orientadora: Dra. Célia Maria de Almeida Soares

Goiânia-GO
2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Análise da expressão de genes envolvidos na manutenção da homeostase de cobre no patógeno humano *Paracoccidioides brasiliensis*.

Mestrando: Rodrigo da Silva Santos

Orientadora: Dra. Célia Maria de Almeida Soares

Linhas de Pesquisa: Biologia Molecular e Bioquímica do Fungo Patogênico Humano *Paracoccidioides brasiliensis* / Genômica Estrutural e Funcional.

Goiânia - GO – 2009

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) 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), 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

Autor (a):	Rodrigo da Silva Santos		
E-mail:	rdssantos@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:		Sigla:	
País:		UF:	
		CNPJ:	
Título:	Análise da expressão de genes envolvidos na manutenção da homeostase de cobre no patógeno humano <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>.		
Palavras-chave:	Cobre, <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>, Expressão Gênica e Infecção		
Título em outra língua:	Analysis of the expression of genes involved in the maintenance of copper homeostasis in the human pathogen <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>.		
Palavras-chave em outra língua:	Copper, <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>, Gene Expression and Infection		
Área de concentração:	Biologia Molecular e Bioquímica		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	29/05/2009		
Programa de Pós-Graduação:	Biologia Celular e Molecular		
Orientador (a):	Dra. Célia Maria de Almeida Soares		
E-mail:	celia@icb.ufg.br		
Co-orientador (a):			
E-mail:			

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

Capítulos. Especifique: _____

Outras restrições: _____

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

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.



Assinatura do (a) autor (a)

Data: **20 / 08 / 2009**

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Análise da expressão de genes envolvidos na manutenção da homeostase de cobre no patógeno humano *Paracoccidioides brasiliensis*.

Mestrando: Rodrigo da Silva Santos

Orientadora: Dra. Célia Maria de Almeida Soares

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Goiânia - GO – 2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

Santos, Rodrigo da Silva

S237a - Análise da expressão de genes envolvidos na manutenção da homeostase de cobre no patógeno humano *Paracoccidioides brasiliensis* [manuscrito] / Rodrigo da Silva Santos. – 2009. xxi, 115f. : il. ; figs., tabs

Orientadora: Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, 2009.

Bibliografia: f. 26-32.

Inclui índice de figuras, tabelas e de abreviaturas.

Anexos.

1. *Paracoccidioides brasiliensis* 2. Homeostase de cobre 3. Expressão Gênica

I. Soares, Célia Maria de Almeida II. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 582.282

Dissertação desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular, Genoma e Proteoma do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás.

Apoio Financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo à Pesquisa de Goiás (FAPEG) – Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado de Goiás (SECTEC-GO).

Banca Examinadora

Titulares

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares – Orientadora – Presidente da Banca

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Profa. Dra. Rosely Maria Zancopé-Oliveira – Membro Externo

Departamento de Micologia - Setor de Imunodiagnóstico
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz - RJ.

Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão – Membro Interno

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Suplentes

Profa. Dra. Maristela Pereira

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Profa. Dra. Sílvia Maria Salem Izacc

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

“Faça o que puder, com o que tiver, onde estiver”

Theodore Roosevelt

"A educação faz um povo fácil de ser liderado, mas difícil de ser dirigido; fácil de ser governado, mas impossível de ser escravizado."

Henry Peter

"Tudo tem seu tempo e até certas manifestações mais vigorosas e originais entram em voga ou saem de moda. Mas a sabedoria tem uma vantagem: é eterna."

Baltasar Gracián

"A educação é aquilo que permanece depois que tudo o que aprendemos foi esquecido."

Burrhus Frederic Skinner

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver..."

Martin Luther King

O Poeta

Ser poeta não é uma ambição minha.
É a minha maneira de estar sozinho.
O poeta é um fingidor.
Finge tão completamente
Que chega a fingir que é dor
A dor que deveras sente.

E os que lêem o que escreve,
Na dor lida sentem bem,
Não as duas que ele teve,
Mas só a que eles não têm.

Quanto mais fundamente penso, mais
Profundamente me descompreendo.
O saber é a inconsciência de ignorar...

Temos, todos que vivemos,
Uma vida que é vivida
E outra vida que é pensada,
E a única vida que temos
É essa que é dividida
Entre a verdadeira e a errada.

O mais que isto
É Jesus Cristo,
Que não sabia nada de finanças
Nem consta que tivesse biblioteca...

Jesus Cristo... E eu sinto que em meu gesto existe o teu gesto e em minha voz a tua voz.

Deus quer, o homem sonha, a obra nasce.

(Adaptações – Fernando Pessoa)



Dedicatória

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida...

O Deus, pelo grandioso Dom da Vida, fonte inesgotável de força e sabedoria.

À minha mãe,

Mulher batalhadora, que sempre lutou pela boa educação dos seus filhos. Além do seu papel de mãe, exerceu o de pai, sempre que precisávamos. Nunca podia estar cansada e nem triste, porque sempre depois da dura jornada de trabalho, tinha sua função mais importante nessa vida, a educação dos seus dois filhos. Mãe rígida e exigente, cobrando sempre o que existia de melhor em mim, mas sempre com amor incondicional. Sempre foi o alicerce do lar, com dignidade, ética, muita força de vontade, competência, inteligência, fé e muito amor.

Mãe, obrigado pelo amor, carinho, dedicação e confiança em mim depositados e por colocar todos os meus planos acima dos seus, exemplo de vida, determinação e fé. Fonte constante de alegria e parceria para eu continuar caminhando.

“O amor de mãe é o combustível que lhe permite a um ser humano fazer o impossível”

(Marion C. Garretty)

Ao meu pai e ao meu irmão (menino com grande potencial), meus grandes e verdadeiros amigos. Meu Pai, homem de grande inteligência, conhecedor das coisas da vida que não se aprende nos livros, cuja própria postura diante da vida é meu maior exemplo dos verdadeiros valores que engradem o homem, pois respeita às pessoas independentemente de raça, cor ou religião. Obrigado por valorizar e reforçar todos os dias a importância da educação na vida do ser humano, obrigado por todo apoio, mesmo compreendendo, porém, não entendendo até hoje porque seu filho escolheu ser biólogo.

Aos meus familiares, obrigado pelas palavras de incentivo. Em especial a minha tia Iolete Ribeiro, que sempre vibra e acha seu sobrinho o máximo, o que na verdade faz um bem danado, nos momentos de desânimo. A minhas tias Domingas e Glória, por todo apoio na área da educação. É claro não podia deixar de agradecer a pessoa que mais “pega no meu pé”, mas que na verdade morre de orgulho do sobrinho, tia Elziene, obrigado.

Dedicatória Especial

À minha avó-mãe (Dona Joana Pereira) *in memoriam*, que participou tão ativamente da minha educação, com broncas e muitos conselhos. Digna e forte, a você grande mulher, mulher de coragem sem fim, que lutou tanto nessa vida para que sua família tivesse o melhor. É Dona Joana, quantas saudades das suas histórias contadas no seu sofá nos dias de domingo, às vezes até repetitivas, mas eram sempre interessantes de escutar, saudades dos seus versos e da sua fé.

Obrigado por sempre ter acreditado e apostado em mim e vibrar por cada conquista minha, mesmo sem entender nada do que o seu neto fazia. Apoiava tudo sem esperar nada em troca, simplesmente pelo amor ao seu neto.

Vó Joana, como já diziam os versos, eu tenho tanto pra te falar, mas com palavras eu não sei dizer como é grande o meu amor por você e nem tenho palavras para expressar tamanha gratidão.

“O Senhor é o meu pastor; nada me faltará. Deitar-me faz em pastos verdejantes; guia-me mansamente a águas tranqüilas. Refrigera a minha alma; guia-me nas veredas da justiça por amor do seu nome. Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal algum, porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam. Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos; unges com óleo a minha cabeça, o meu cálice transborda. Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida, e habitarei na casa do Senhor por longos dias” Salmo 23.

Descanse em paz mãe querida, adorável vó, grande amiga. Sei que a nossa separação é apenas temporária. Agora mais do que nunca, pode estar certa, estaremos unidos de verdade. Continue rezando por nós e abençoando a nossa vida. Eu lhe dedico mais esta minha conquista.

Agradecimento Especial

À minha orientadora Dra. Célia Maria de Almeida Soares, pela oportunidade de me integrar em seu grupo de pesquisa e prosseguir meus estudos. Ter sido seu aluno de iniciação científica e mestrado me proporcionou além de muito conhecimento, crescimento e amadurecimento profissional, além de me fazer realmente compreender o que estou escolhendo para minha vida. Sob sua orientação descobri o verdadeiro sentido da palavra profissionalismo. Fazer parte do grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Molecular é um grande diferencial na minha vida profissional. Parabéns por fazer acontecer, mesmo quando as condições oferecidas não são adequadas, pelo seu exemplo de competência e dedicação à pesquisa, empenho, seriedade e espírito científico, pela sua paciência em tentar entender as minhas fraquezas e demonstrar que eu sempre podia mais, que nunca existiam limites para os meus objetivos. Agradeço ainda pela oportunidade de trabalhar em um laboratório preocupado em obter recursos financeiros para o desenvolvimento profissional dos seus alunos e comprometido com o bem público, onde se procura justificar, em forma de publicações, o suporte financeiro recebido. Você sempre terá minha admiração e o meu respeito.

À Dra. Mônica Santiago Barbosa e ao Dr. Alexandre Melo Bailão, ou simplesmente, meus amigos Moc e Betão. Vocês estão entre as melhores pessoas que conheci nesses vinte e poucos anos, passaram pela minha vida e são grandes responsáveis pelas minhas conquistas. Fico feliz por Deus me permitir escolher grandes irmãos. Vocês dois são pessoas justas, humanas, honestas e de índole inquestionável. Profissionais extremamente competentes com um futuro brilhante. Todo sucesso nessa vida será pouco para vocês. Obrigado pelos momentos de diversão e paciência com o amigo mal humorado. Tenho enorme admiração e pode ter certeza, foi uma honra aprender com vocês, meus dois grandes exemplos.

Agradecimentos

À minha irmã Nathalie Martelli, minha amiga faltam palavras para agradecer e expressar a minha gratidão por tantos anos de lealdade e união. Você é um ser humano maravilhoso. Nossa parceria foi fundamental durante esse período de mestrado. Sempre quando precisar encontrará em mim um irmão, disposto a tentar fazer o impossível para te ajudar, assim como você tentou e fez muitas vezes por mim. Tenho muito orgulho de ser amigo da família Martelli e pode ter certeza, ainda vamos trabalhar muito em parceria. E não poderia deixar de agradecer todos os seus carinhos, na maioria das vezes exagerados em forma de apelidos bem criativos. Tenho muito orgulho de ser seu amigo.

À minha amiga e parceira Patrícia Lima (Espetáculo), quem diria em Paty, que seríamos tão parceiros assim, lembra das voltas noturnas do campus? Quem estava mais cansado hein e ainda cantava sertanejo? Obrigado pelos momentos de alegria, pelas palavras amigas na hora em que mais precisava, pela confiança, apoio e acima de tudo pelo seu valor como ser humano. Valeu minha amiga do peito.

Aos meus grandes amigos: Mariana Tomazett, Sabrina Dantas e Ronney Brasil, sem vocês nada teria acontecido e tudo seria um pouco mais difícil. Pessoal, foram muitas manhãs e tardes alegres juntos. O que dizer das críticas do Ronney Brasil, a filosofia da Sabrina e o principal que foi a paciência da Mariana Marruá, tanta paciência que chega a ser uma virtude. Meus amigos, obrigado pelo apoio constante e a nossa amizade e união será eterna. Tenho muito orgulho de vocês.

Durante a graduação muitos colegas passam, porém poucos amigos ficam. Quero fazer um agradecimento especial aos meus amigos verdadeiros que mesmo de longe me apoiaram: Luana Cristina, Samara Portela, Suelene Ribeiro, Lorenzo Coelho, Mariana Mota, Kárita Antunes e Marcela Suriani. Em especial aos amigos Leonardo Barcelos e Angela Adamski, obrigado por apoiar meus futuros projetos e a nossa parceria ainda vai muito longe. Amigos o apoio de vocês foi fundamental. Valeu!!!

Ao amigo Clayton Borges (Dr. Claytim), valeu por toda ajuda e por sempre estar disponível com sua mão amiga quando eu mais precisava. Sem a sua ajuda, muita coisa teria sido mais difícil. Lembre-se, seu trabalho sempre será fundamental para o bom andamento do grupo de pesquisa LBM. Obrigado também pelos conselhos de irmão mais velho, que vem sempre na hora certa e me direcionam para escolher o melhor.

Ao amigo Wesley Brito (Tchatchá), foram muitos momentos de diversão e aprendizado. Você é um profissional de conhecimentos particulares incríveis. Você realmente apresenta a verdadeira essência de um pesquisador. Vou me espelhar sempre na sua postura profissional.

A amiga Gleize, que possui como sobrenome o termo competência. Pessoa de caráter inquestionável, um ser humano fantástico, que além de cuidar muito bem do programa de pós-graduação em Biologia, tem sempre as palavras certas e o abraço acolhedor que precisamos durante essa jornada, às vezes tão estressante.

A professora Dra. Rosely Maria Zancopé-Oliveira, por ter aceitado participar da minha banca. Sempre tão alegre, sorridente e divertida, seja nos congressos ou quando nos visita. Além de ser uma pesquisadora reconhecida e competente. É uma honra ser avaliado por você. Obrigado!!!

As professoras do Laboratório de Biologia Molecular ICB-UFG: Maristela Pereira e Sílvia Salem-Izacc por se mostrarem sempre prestativas, dividindo seus conhecimentos e simplificando as dúvidas que surgem durante os trabalhos no laboratório. Maristela obrigado pelo sorriso agradável e pelas boas risadas. Sílvia você é a professora mais divertida e parceira em congressos, de competência inquestionável. Obrigado!!!!

Aos meus estagiários e amigos Leandro, Hérica e Dayane (Rodrigo tenho uma dúvida!!!!!!), obrigado por ter aprendido a ensinar com vocês. Espero ter contribuído verdadeiramente na formação científica de vocês.

A amiga Kelly Pacheco de Castro, além de tantos momentos de diversão, quero deixar claro minha gratidão, pois sua ajuda foi fundamental para a finalização deste trabalho. Obrigado!

Ao amigo Neto, pessoa de grande carisma, inteligência, religioso e humano. Companheiro de mestrado, que passei a admirar todos os dias. Fala meu parceiro!!!!

Às minhas amigas Elisa Flávia & Mirelle, não poderia nunca deixar de agradecer vocês juntas. Vocês são meninas muito especiais. Tem um presente de sucesso e um futuro brilhante. Obrigado pela amizade, toda ajuda no decorrer dos experimentos e pela paciência com o Rodrigo chato. Vocês sempre terão em mim um amigo.

À minha amiga Daciene Grossklaus, pouco tempo de convivência e uma amizade tão fantástica. Dacie, obrigado pelo apoio nos momentos de desespero e pelos choques de realidade.

As amigas Cristina (Rainha do Proteoma), Ana Flávia Parente (Fafá), Sarah (X-Princesa) e Patrícia Kott (Menina muito especial), trabalhar com vocês foi muito agradável e prazeroso.

À minha amiga Aline Helena, menina agradável, carismática e que transmite muita paz e confiança a todos os seus amigos. Foram bem divertidos nossos bate-papos na volta para casa.

À minha amiga Cinthia Paixão, responsável pelo começo de tudo. Palavras não representarão minha gratidão por você, que como minha professora de bioquímica, acreditou e apostou no que você dizia ser o meu verdadeiro talento.

Aos grandes amigos e companheiros do Laboratório de Biologia Molecular, sem vocês tudo teria sido mais difícil: Juliana Parente (Jú!!!), Rogério Troian, Milce, Karinne, Bernadette, Moniquinha (abraço de quebrar as costelas), Patrícia Zambuzzi, Bruno, Hellen, Ademar, Ivian, Renata (A Bela!!!), Regilda, Amanda, Raquel, João Guilherme, Martha, Nadya Castro, Luiz, Simone Weber, Keila, Cristhielly, Zilma, Lidiane e a todos os alunos com quem convivi no desenvolvimento deste projeto. Um agradecimento especial também a minha amiga Lorena Cintra (Laboratório de Biotecnologia de Fungos), obrigado pelos abraços, carinhos, sorrisos e acima de tudo pela força e amizade.

Aos professores do Instituto de Ciências Biológicas, em especial ao Prof. Dr. Cirano (Laboratório de Enzimologia), um grande amigo que sempre terá minha admiração. Como pode tanto profissionalismo e ética em uma única pessoa. Com o Prof. Cirano aprendemos que o bom pesquisador tem que ser também um bom professor. Lembro até hoje, no último dia da sua disciplina de metabolismo celular, no final do meu seminário, quando você disse que eu já era um professor nato (que já estava pronto), este foi um fato que marcou muito e pode ter certeza, prometo nunca decepcionar. Obrigado!!!!

À Dona Zildete (*in memoriam*), Dona Dora e a todas as mulheres do grupo da “Morgano” que trabalham nos auxiliando na limpeza do laboratório! Obrigada pelo cuidado com o laboratório e pela simpatia!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado oferecida. Sem esse auxílio tudo teria sido mais difícil. A Universidade Federal de Goiás, sempre preocupada em formar grandes profissionais.

É impossível, entretanto, nominar todas as pessoas que me ajudaram nessa jornada, mas eu tentei. Minhas desculpas aos que não foram citados, mas minha eterna gratidão a todos que possibilitaram a execução desse trabalho.

“Vim, vi e venci”

Julio César – Imperador Romano (100 a.C.- 44 a.C.),

Sumário

	Página
RESUMO	XX
ABSTRACT	XXI
I. INTRODUÇÃO	22
I.1 – BIOLOGIA E ASPECTOS GERAIS DO FUNGO <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	22
I.2 – A DOENÇA PARACOCCIDIOIDOMICOSE (PCM)	28
I.3 – HOMEOSTASE DE COBRE – ASPECTOS GERAIS	31
I.4 – TRANSPORTADOR DE COBRE DE ALTA AFINIDADE (<i>ctr3</i>): UM GENE DIFERENCIALMENTE EXPRESSO EM <i>P. brasiliensis</i> .	43
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	45
II – JUSTIFICATIVA	45
III – OBJETIVOS	46
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	47
IV.1 – FLUXOGRAMA	47
IV.2 – MICRORGANISMO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	48
IV.3 – OBTENÇÃO DO cDNA E GENE CODIFICANTES PARA O TRANSPORTADOR DE COBRE DE ALTA AFINIDADE (<i>PbCTR3</i>)	48
IV.4 – SEQÜENCIAMENTO DE DNA	50
IV.5 – ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA	51
IV.6 – RASTREAMENTO E IDENTIFICAÇÃO <i>IN SILICO</i> DE GENES RELACIONADOS À MANUTENÇÃO DA HOMEOSTASE DE COBRE EM <i>P. brasiliensis</i> .	52

IV.7 – EXPERIMENTOS DE DEPLEÇÃO DE COBRE E FERRO EM <i>P. brasiliensis</i> .	53
IV.8 – INFECÇÃO EXPERIMENTAL	56
IV.9 – EXTRAÇÃO DE RNA (TRIZOL [®])	57
IV.10 – SÍNTESE DE CDNA E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR QRT-PCR EM TEMPO REAL.	59
V – RESULTADOS	61
VI.1 – CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO CDNA E GENE CODIFICANTES PARA O TRANSPORTADOR DE COBRE DE ALTA AFINIDADE (<i>PbCTR3</i>) DE <i>P. brasiliensis</i>	61
VI.2 – ANÁLISE COMPARATIVA DA SEQÜÊNCIA DEDUZIDA DE AMINOÁCIDOS DE (<i>PbCTR3</i>) DE <i>P. brasiliensis</i>	65
VI.3 – RASTREAMENTO E IDENTIFICAÇÃO <i>IN SILICO</i> DE GENES RELACIONADOS À MANUTENÇÃO DA HOMEOSTASE DE COBRE EM <i>P. brasiliensis</i> .	67
VI.4 – ANÁLISES DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE COBRE EM <i>P. brasiliensis</i> DURANTE CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO DE COBRE E FERRO.	69
VI.5 – ANÁLISES DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE COBRE EM CÉLULAS LEVEDURIFORMES DE <i>P. brasiliensis</i> DERIVADAS DE ÓRGÃOS DE ANIMAIS INFECTADOS.	71

VI – DISCUSSÃO	72
VII – CONCLUSÕES	81
VIII – PERSPECTIVAS	83
IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
X – ANEXOS	101
X.1 – ANÁLISE DE INTERAÇÕES INTER-MOLECULARES DO TRANSPORTADOR DE COBRE DE ALTA AFINIDADE (<i>PbCTR3</i>) DE <i>P. brasiliensis</i> ATRAVÉS DA TÉCNICA DE DUPLO-HÍBRIDO.	101
X.2 – OBTENÇÃO DO ANTICORPO POLICLONAL ANTI- <i>PbCTR3</i> E <i>WESTERN BLOT</i> .	105
X.3 – DEPÓSITO E PUBLICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS DE CDNA E GENE CODIFICANTES PARA O TRANSPORTADOR DE COBRE DE ALTA AFINIDADE (<i>PbCTR3</i>) NO BANCO DE DADOS DO NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI).	110
X.4 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O MESTRADO	111
X.4.1 – ARTIGO CIENTÍFICO (CO-AUTORIA): IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIGENIC PROTEINS POTENTIALLY EXPRESSED DURING THE INFECTIONS PROCESS OF <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> - MICROBES AND INFECTION (2009).	111
X.4.2 – TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS (NACIONAL E INTERNACIONAL).	112
X.4.3 – PRÊMIO COMUNICAÇÃO ORAL (2008) – SOCIEDADE BRASILEIRA DE GENÉTICA – MELHOR TRABALHO APRESENTADO NA ÁREA DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS.	115

Índice de Figuras

	Página
Figura 01: Distribuição geográfica da Paracoccidioidomicose	30
Figura 02: Modelo estrutural para os transportadores de cobre de alta afinidade (CTRs)	35
Figura 03: Modelo da localização celular das proteínas transportadoras de cobre de alta afinidade (CTR's) proposto para <i>S.cerevisiae</i>	37
Figura 04: Modelo proposto para manutenção da homeostase de cobre no patógeno humano <i>C. neoformans</i>	40
Figura 05: Fluxograma representativo das metas experimentais realizadas neste trabalho.	47
Figura 06: Condições de crescimento de <i>P. brasiliensis</i> durante privação de cobre e ferro.	54
Figura 07: Seqüência de nucleotídeos do cDNA e seqüência deduzida de aminoácidos de <i>PbCTR3</i> .	62
Figura 08: Seqüência genômica de <i>PbCTR3</i> e seqüência deduzida de aminoácidos	64
Figura 09: Alinhamento da seqüência deduzida de aminoácidos de <i>PbCTR3</i> com proteínas homólogas	66
Figura 10: Modelo proposto para manutenção da homeostase de cobre no patógeno humano <i>P. brasiliensis</i>	68
Figura 11: Análise da expressão de genes envolvidos na manutenção da homeostase de cobre em <i>P. brasiliensis</i> , durante privação de cobre e ferro.	70
Figura 12: Análise da expressão dos genes <i>Pbctr3</i> e <i>Pbcrp</i> durante o processo infectivo.	71
Figura 13: Esquema da técnica do duplo híbrido em leveduras	102
Figura 14: Gráfico correspondente a análise de hidropatia da molécula <i>PbCTR3</i>	105
Figura 15: Seqüência deduzida de aminoácidos de <i>PbCTR3</i> com proteínas homólogas, evidenciando a região selecionada para a síntese do peptídeo.	106
Figura 16: Análise por <i>Western blot</i> do transportador de cobre de alta afinidade (<i>PbCTR3</i>) de <i>P.brasiliensis</i> .	108

Índice de Tabelas

	Página
Tabela 01: Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene codificante para <i>PbCTR3</i>	49
Tabela 02: Meio Mínimo Mc Veigh & Morton (MMcM)	54
Tabela 03: Solução de Vitaminas	55
Tabela 04: Solução de Elementos Traços	56
Tabela 05: Porcentagem de identidade e similaridade da sequência de aminoácidos de <i>PbCTR3</i> e <i>CTR3</i> de diferentes organismos depositadas em banco de dados	66
Tabela 06: Interações preditas de <i>PbCTR3</i> com outras moléculas: resultados obtidos pelo sistema de duplo-híbrido em leveduras	103

Lista de Abreviaturas

AD - domínio de ativação da transcrição

ATP – adenosina trifosfato

ATX1- chaperona de cobre

BCIP - 5-bromo-4-chloro-3-indolil fosfato

BD - domínio de ligação ao DNA

cAMP - adenosina monofosfato cíclico

CAO – cobre amino oxidase

CCC2 - transportador de cobre do aparato de Golgi.

cDNA – DNA complementar

CRP– proteína responsiva ao cobre

CTR3 – transportador de cobre de alta afinidade

Cu – íon cobre

Cuf 1 – fator de transcrição cobre-dependente

DNA – ácido desoxirribonucléico

EBP – proteína que liga-se ao estradiol

Fe – íon ferro

FRE – ferro redutase

ITS – seqüência espaçadora interna – “internally transcribed sequence”

Kb – Kilobases

kDa – kiloDalton

MAPK – proteína quinase ativada por mitose

Mb – megabases

mRNA – RNA mensageiro

NBT - nitro blue tatrazólio

ORF – região de leitura aberta

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

Pb – *Paracoccidioides brasiliensis*

pb/bp - pares de bases

PBS – solução de tampão fosfato

PCM – paracoccidioidomicose

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH - potencial hidrogeniônico

pI - ponto isoelétrico

RDA – análise de diferença representacional

rDNA – DNA ribossomal

RNA – ácido ribonucléico

rRNA – RNA ribossomal

SOD – superóxido dismutase

ZRT1 - transportador de zinco/ferro de alta afinidade

Resumo

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é um patógeno humano com ampla distribuição na América Latina. O fungo causa a paracoccidioidomicose quando propágulos da fase miceliana atingem os pulmões do hospedeiro. O sucesso da infecção depende da aquisição de micronutrientes essenciais como o cobre, o qual é requerido como cofator por uma diversidade de enzimas importantes em processos biológicos essenciais, tais como: respiração, crescimento e aquisição de ferro. Estudos prévios, do Laboratório de Biologia Molecular, demonstraram que um transportador de cobre de alta afinidade (*PbCTR3*) é uma molécula altamente expressa e provavelmente necessária para o estabelecimento da infecção por *P. brasiliensis*. No presente estudo foram isoladas e caracterizadas as seqüências genômica e do cDNA que codificam para *PbCTR3* de *P. brasiliensis*. O cDNA apresentou 582 pares de bases e codifica para uma proteína com 193 aminoácidos, massa molecular predita de 21,5 kDa e pI de 8.6. A seqüência genômica apresenta quatro exons interrompidos por três introns. Análises *in silico* foram realizadas no banco de dados do genoma estrutural de *P. brasiliensis* (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html), onde genes envolvidos na manutenção da homeostase de cobre foram identificados e as seqüências utilizadas para a elaboração de um modelo de fatores envolvidos na manutenção da homeostase de cobre por *P. brasiliensis*. O comportamento transcricional do gene *Pbctr3* e de genes envolvidos na manutenção da homeostase de cobre foram analisados durante a exposição de células leveduriformes de *P. brasiliensis* em condições de depleção de cobre e ferro por qRT-PCR em tempo real. Foi demonstrada uma alteração significativa no nível de transcrição dos genes na ausência de cobre, assim como na ausência combinada dos dois metais. qRT-PCR em tempo real foi utilizado para analisar a expressão de *Pbctr3* e de *Pbcrp* (que codifica uma proteína responsiva ao cobre) em células leveduriformes de *P. brasiliensis* derivadas de pulmão e baço infectados, em diferentes tempos. A expressão de *Pbctr3* e *Pbcrp* foi super-regulada durante a infecção experimental. Tomados em conjunto, esses dados sugerem a importância de *Pbctr3* e do sistema de absorção cobre/ferro durante o processo infeccioso.

Palavras chave: cobre, *Paracoccidioides brasiliensis*, expressão gênica e infecção

Abstract

The fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is a human pathogen with a wide distribution in Latin America. The fungus causes paracoccidioidomycosis when mycelia reaches the lungs. The success of the infection depends on the acquisition of essential micronutrients such as copper, which is required as cofactor for a variety of enzymes important in biological in several processes, such as respiration, growth and acquisition of iron. Previous studies, of the Laboratory of Molecular Biology showed that a high affinity copper transporter (*PbCTR3*) is a molecule highly expressed and probably necessary for the infection establishment of by *P. brasiliensis*. In the present study were isolated and characterized the genomic and cDNA sequences encoding for *PbCTR3* of *P. brasiliensis*. The cDNA presented 582 base pairs and encodes for a protein with 193 amino acids, predicted molecular mass of 21.5 kDa and pI of 8.6. The genomic sequence has four exons interrupted by three introns. *In silico* analysis was performed on the database of the structural genome of *P. brasiliensis* (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensisMultiHome.html), where genes involved in maintaining the homeostasis of copper have been identified and used to design of a model of copper homeostasis in *P. brasiliensis*. The transcriptional behavior of *Pbctr3* and genes involved in copper homeostasis were examined during exposure of yeast cells of *P. brasiliensis* to copper and iron depletion conditions, by real time qRT-PCR. It was demonstrated a significant change in transcription level those of genes in the absence of copper, as well as in the combined absence of both metals. qRT-PCR was used to analyze the expression of *Pbctr3* and *Pbcrp* (which encodes a protein responsive to copper) in yeast cells of *P. brasiliensis* derived from infected lungs and spleen at different time points of infection. The expression of *Pbctr3* and *Pbcrp* was super-regulated during experimental infection. Taken together, these data suggest the importance of *PbCtr3* and of absorbing copper / iron during the infectious process.

Key words: copper, *Paracoccidioides brasiliensis*, gene expression and infection

INTRODUÇÃO

I – Introdução

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

Os fungos são caracterizados por serem agentes comuns em todo ecossistema, onde são organismos de vida livre e saprobiótica, desempenhando um papel fundamental ao ser um dos constituintes da base de cadeias e teias alimentares, fazendo a decomposição da matéria orgânica. Estes microrganismos possuem um importante papel na saúde dos animais, causando desde micoses classificadas como cutâneas até micoses sistêmicas (Murray *et al.* 2004; Schaechter *et al.* 2002).

Embora existam aproximadamente 100.000 espécies fúngicas, apenas um pequeno grupo causa micose sistêmica humana (San-Blas & Niño-Vega, 2004). Os fungos dimórficos são responsáveis pela maior parte das infecções fúngicas sistêmicas de humanos e outros mamíferos. O processo da doença é marcado pela conversão do fungo de uma forma infecciosa não patogênica, presente no ambiente, para uma forma patogênica, morfológicamente distinta, no tecido. Conídios ou fragmentos dispersos no solo é a forma infecciosa primária desses agentes, atingindo o hospedeiro pela via respiratória e após a inalação, rapidamente convertem-se à forma leveduriforme. A infecção pode resultar desde uma micose pulmonar contida ou assintomática até doença fatal (Rappleye & Goldman, 2006).

Os organismos causadores de micoses sistêmicas humanas são inerentemente virulentos, como é o caso do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, patógeno humano agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM) (Lutz, 1908). A forma infectiva, miceliana é encontrada em condições saprobióticas no ambiente, ou quando cultivada em temperaturas

inferiores a 28°C (Brumer *et al.*, 1993). A forma miceliana do fungo é caracterizada por micélios septados com conídios terminais ou intercalares. A forma leveduriforme parasitária se desenvolve nos tecidos infectados ou quando cultivada *in vitro* a 36°C, sendo caracterizada por apresentar brotamentos múltiplos originados por evaginações da célula-mãe, onde uma célula central grande é circundada por células periféricas menores, apresentando um aspecto de roda de leme de navio, o que caracteriza a presença de *P. brasiliensis* em materiais biológicos (Queiroz-Telles, 1994; Restrepo-Moreno, 2003).

P. brasiliensis é um fungo caracterizado por apresentar dimorfismo térmico, aspecto importante como mecanismo de virulência e de patogenicidade. A transição entre as morfologias de micélio e levedura constitui-se em uma etapa essencial para o sucesso no estabelecimento da infecção e para a fase inicial da interação do fungo com o hospedeiro (San-Blas *et al.*, 1987). Um dos estímulos ambientais mais notórios no dimorfismo do *P. brasiliensis* é a temperatura. O fungo se apresenta como micélio a 22°C-25°C e como levedura a 35°C-37°C (Brumer *et al.*, 1993). Além da temperatura, fatores nutricionais também podem interferir no processo dimórfico do patógeno. A adição de soro fetal bovino tanto à meio de cultura complexo quanto à meio quimicamente definido permitiu preservar a expressão fenotípica de leveduras, a 25° C (Villar *et al.*, 1988).

Um dos aspectos da relação entre o parasita e o hospedeiro é o efeito de hormônios no dimorfismo do fungo. A alta incidência de PCM em adultos masculinos sugere que fatores hormonais possam desempenhar papel na patogênese da doença (Sano *et al.*, 1999). Estudos mostraram que o hormônio 17-β-estradiol é capaz de inibir a transição de micélio para levedura de maneira dose-dependente, *in vitro* (Restrepo, 1985), e *in vivo* (Sano *et al.*, 1999). Aristizabal *et al.*, (2002) observaram, *in vivo*, a participação do hormônio feminino na

resistência de fêmeas de rato ao desenvolvimento inicial da PCM. Análises transcricionais (Felipe *et al.*, 2005) descreveram um gene preferencialmente expresso na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* que potencialmente codifica uma proteína de ligação ao 17- β -estradiol, previamente caracterizada (Loose *et al.*, 1983). A EBP (“Estradiol Binding Protein”) possui interação seletiva a estrogênios ligando-se ao estradiol no citoplasma (Clemons *et al.*, 1989; Loose *et al.*, 1983). Acredita-se que a interação do hormônio 17- β -estradiol com a EBP citoplasmática iniba a transição de micélio para levedura, explicando a baixa incidência da PCM em mulheres.

O perfil transcricional de *P. brasiliensis* durante a diferenciação morfológica de micélio para levedura foi avaliado por Bastos *et al.* (2007). Vários transcritos potencialmente relacionados com a síntese de membrana e parede celulares mostraram-se aumentados durante a diferenciação celular de micélio para levedura, após 22 horas de indução da transição, sugerindo que *P. brasiliensis* priorize o remodelamento da membrana e de parede celulares nos estágios iniciais da morfogênese. Neste estudo, genes envolvidos na via de assimilação do enxofre como a sulfito redutase, mostraram-se super expressos durante a transição, sugerindo o envolvimento do metabolismo do enxofre durante o processo de diferenciação em *P. brasiliensis*. Durante a transição dimórfica também foi verificada a presença de enzimas que participam do ciclo do glioxalato, como isocitrato liase, malato desidrogenase, citrato sintase e aconitase. A presença destes transcritos durante a diferenciação indica que esta via é funcional durante esse processo. Também foram identificados genes envolvidos em vias de transdução de sinal tais como MAPK, serina/treonina quinase e histidina quinase, sugerindo que a transição morfológica em *P. brasiliensis* é mediada por vias de transdução de sinal que controlam a adaptação ao ambiente para a sobrevivência do fungo dentro do hospedeiro.

Estudos filogenéticos moleculares em fungos vêm sendo focados particularmente no RNA ribossomal (rRNA) e no DNA ribossomal (rDNA), sendo importantes ferramentas na distinção de espécies (James *et al.*, 1996). A comparação filogenética de dermatófitos e de fungos dimórficos baseados na subunidade ribossomal 18S, classificou *P. brasiliensis*, mais precisamente, como pertencente ao filo Ascomycota, à ordem Onygenales e à família Onygenaceae, juntamente com *Blastomyces dermatidis* e *Histoplasma capsulatum* (Leclerc *et al.*, 1994; Bialek *et al.*, 2000). Atualmente com base em estudos de filogenia molecular, *P. brasiliensis* é descrito como pertencente ao reino Fungi, filo Ascomycota, subdivisão Euascomycotina, classe Plectomyceto, subclasse Euascomycetidae, ordem Onygenales, família Onygenaceae, subfamília Onygenaceae Anamórficos, gênero Paracoccidioides, espécie *Paracoccidioides brasiliensis* (San-Blas *et al.*, 2002). Três espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* S1, PS2 e PS3 foram identificados, através de dados de polimorfismo genético. A espécie filogenética PS3 encontra-se restrita à Colômbia, enquanto S1, que tem como representante o *Pb18*, distribui-se no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela. Isolados da espécie PS2 foram também encontrados no Brasil e Venezuela. Todas as três espécies foram capazes de induzir a doença em hospedeiros humanos e animais; entretanto uma menor virulência tem sido verificada nas espécies PS2 (Matute *et al.*, 2006).

Ainda com o objetivo de se estabelecer relações filogenéticas entre isolados de *P. brasiliensis*, análises foram realizadas com base na comparação de seqüências de regiões codantes, não codantes e seqüências espaçadoras internas - ITS (internally transcribed sequence) de 21 isolados. Todos os isolados analisados se agruparam nos três grupos filogenéticos anteriormente descritos. O isolado *Pb01*, apresentou-se filogeneticamente distinto dos outros isolados analisados, agrupando-se apenas com o isolado IFM 54648,

obtido de um paciente do estado do Paraná/Brasil. Os resultados obtidos sugerem a possibilidade de ocorrência de mais de três espécies filogenéticas em *P. brasiliensis*. Os isolados *Pb01* e IFM 54648 apresentam-se geneticamente separados dos outros isolados por um longo período de tempo, sugerindo que os mesmos possam constituir uma nova espécie do gênero *Paracoccidioides* (Carrero *et al.*, 2008).

O nicho ecológico do *P. brasiliensis* ainda não está completamente esclarecido. Entretanto algumas hipóteses são descritas. Alguns estudos sugerem que o fungo viva saprobicamente na natureza, pois o mesmo já foi isolado de solo, água e plantas (Restrepo *et al.*, 2001). Devido à presença de poucos isolados de *P. brasiliensis* no solo, acredita-se que este ambiente não seja o habitat permanente do patógeno, sugerindo que o fungo resida por tempo variável nestes locais (Conti-Diaz, 2007). Theodoro e colaboradores (2005) sugeriram que alguns tipos de solos devem ser mais favoráveis à produção de conídios, um aspecto importante por aumentar a eficiência de sobrevivência do microrganismo no meio ambiente, bem como a capacidade de infectar humanos. Corroborando essa hipótese, Franco e colaboradores (2000) demonstraram que diferentes condições do solo alteram a capacidade de crescimento da forma miceliana e a produção de conídeos por *P. brasiliensis*. Experimentos realizados por Terçarioli e colaboradores (2007) envolvendo o cultivo de vários isolados de *P. brasiliensis* em diferentes tipos de solo demonstraram que este fungo apresenta a capacidade de crescimento em solos arenosos e argilosos, com alta umidade, sendo que em alguns isolados, pode-se observar a produção de conídios.

Presume-se que o fungo *P. brasiliensis* ocorra normalmente em ambientes úmidos, próximos a rios, onde possa ser protegido por representantes de espécies aquáticas heterotérmicas como moluscos, anfíbios, peixes e artrópodes. Estes organismos estariam

fornecendo ao parasita nutrientes, umidade, competição biológica limitada e temperatura apropriada para a sobrevivência do micélio no meio ambiente (Conti-Diaz, 2007). A infecção natural do fungo em alguns animais silvestres como tatus (*Dasybus novemcinctus*, *Dasybus septemcinctus* e *Cabassous centralis*) e animais domésticos, como cachorros (*Canis familiares*), também tem sido observada; entretanto estes organismos devem ser considerados hospedeiros acidentais e não reservas naturais do fungo, pois os mesmos podem ser acometidos com a doença (Conti-Diaz, 2007).

Estudos de detecção molecular de *P. brasiliensis* realizados por Richini-Pereira e colaboradores (2007) em animais selvagens mortos encontrados em estradas e rodovias, foram realizados, por meio da técnica de Nested-PCR (reação em cadeia da polimerase) com oligonucleotídeos ITS específicos para *P. brasiliensis*. Foi detectada a presença do fungo em tatu (*Dasybus sp.*), porco-da-índia (*Cavia aperea*), porco espinho (*Sphigurrus spinosus*), guaxinim (*Procyon cancrivorus*) e furão (*Gallictis vittata*). Os dados revelam que a infecção em animais silvestres de áreas endêmicas é mais alta do que era proposto inicialmente e demonstram a importância do uso de animais mortos em estradas no estudo eco-epidemiológico do fungo.

A organização genômica do *P. brasiliensis* tem sido investigada. Utilizando-se a técnica de gel em eletroforese de pulso alternado (PFGE) foi possível identificar-se 4 ou 5 cromossomos com 2-10 Mb tanto de fungos isolados do meio ambiente, quanto de isolados clínicos. Desta maneira, estimou-se que *P. brasiliensis* apresentasse um genoma variando entre 23-31 Mb (Feitosa *et al.*, 2003). Estudos com 10 isolados de *P. brasiliensis*, por citometria de fluxo, incluindo representantes das três espécies filogenéticas recentemente identificadas, demonstraram que o fungo apresentava um genoma variando de 26,3 a 35,5 Mb

por célula de leveduras uninucleadas. O genoma dos conídios apresentou um tamanho de 30,2 a 30,9 Mb, não havendo, portanto, nenhuma diferença significativa com a forma de levedura (Almeida *et al.*, 2007). Os genomas estruturais de três isolados de *P. brasiliensis* (*Pb01*, *Pb03* e *Pb18*) foram completados através do projeto denominado "Genômica Comparativa de *Coccidioides* e outros Fungos Dimórficos" (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html), confirmando a presença de 5 cromossomos em cada isolado. O genoma do isolado *Pb01* é composto de 32,94 Mb, com um total de 9.132 genes. Este isolado apresenta o genoma maior tanto em número de bases quanto em quantidade de genes comparado aos outros dois isolados analisados, que apresentaram genomas do tamanho de 29,06 e 29,95 Mb, com número de genes de 7.875 e 8.741 (dados dos isolados *Pb03* e *Pb18*, respectivamente). Os resultados obtidos além de auxiliar na compreensão das diferenças existentes entre os isolados proporcionarão a caracterização de genes e suas regiões promotoras, e o desenvolvimento de novas ferramentas biomoleculares e genéticas para a elucidação de aspectos da biologia de *P. brasiliensis*, que até então são desconhecidos.

I. 2 – A doença Paracoccidioidomicose (PCM)

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose humana sistêmica granulomatosa, enfermidade de alta prevalência e morbidade que acomete parcelas da população com menor capacidade de acesso a serviços de saúde, em áreas limitadas somente a alguns países da América Latina. O fungo *P. brasiliensis* infecta hospedeiros humanos usualmente através das vias respiratórias, por inalação de propágulos do micélio e artroconídeos (Bagagli *et al.*, 2006). A primeira interação parasita-hospedeiro ocorre nos alvéolos pulmonares; a partir dos

pulmões, o fungo pode disseminar-se por vias hematogênica ou linfática acometendo outros órgãos e sistemas como fígado, baço, ossos e sistema nervoso central (Camargo & Franco, 2000; San-Blas, 1993; Valera *et al.*, 2008).

A PCM apresenta duas formas clínicas principais: forma aguda ou subaguda (juvenil) e forma crônica (adulta). A forma juvenil atinge crianças de ambos os sexos, tem evolução mais rápida e é mais severa levando a taxas de mortalidade significantes, afetando principalmente o sistema retículo endotelial. A forma adulta, por sua vez, é altamente prevalente entre adultos do sexo masculino, tem progressão lenta e compromete primeiramente os pulmões, podendo a partir daí disseminar-se para outros órgãos e tecidos formando lesões secundárias (Franco, 1987). O progresso da patologia e a diversidade das formas clínicas dependem dos fatores imunológicos do hospedeiro (Franco, 1987) e dos diferentes níveis de virulência dos diversos tipos de isolados do fungo (Panunto-Castelo *et al.*, 2003; San-Blas & Nino-Vega, 2001)

A distribuição geográfica da PCM apresenta-se restrita à países da América Latina, onde um grande número de habitantes é acometido (**Figura 1**) (Brummer *et al.*, 1993; Lacaz *et al.*, 1991). O Brasil é considerado o maior centro endêmico desta micose, pois 80% dos casos da doença descritos na literatura foram diagnosticados no país. As regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste apresentam o maior número de registros (Paniago *et al.*, 2003). A moléstia é responsável por 200 mortes ao ano aproximadamente, representando um grande problema de saúde pública. De acordo com os registros do Ministério da Saúde, de 1980 a 1995 ocorreram no Brasil 3.181 casos de óbito, o que totaliza uma taxa de mortalidade por PCM de 1,45 casos por milhão de habitantes. Esses dados apontam a PCM como a oitava causa de mortalidade por doença infecciosa. Desta forma, a doença representa um importante problema de saúde

pública devido ao seu alto potencial incapacitante e à quantidade de mortes prematuras que provoca (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

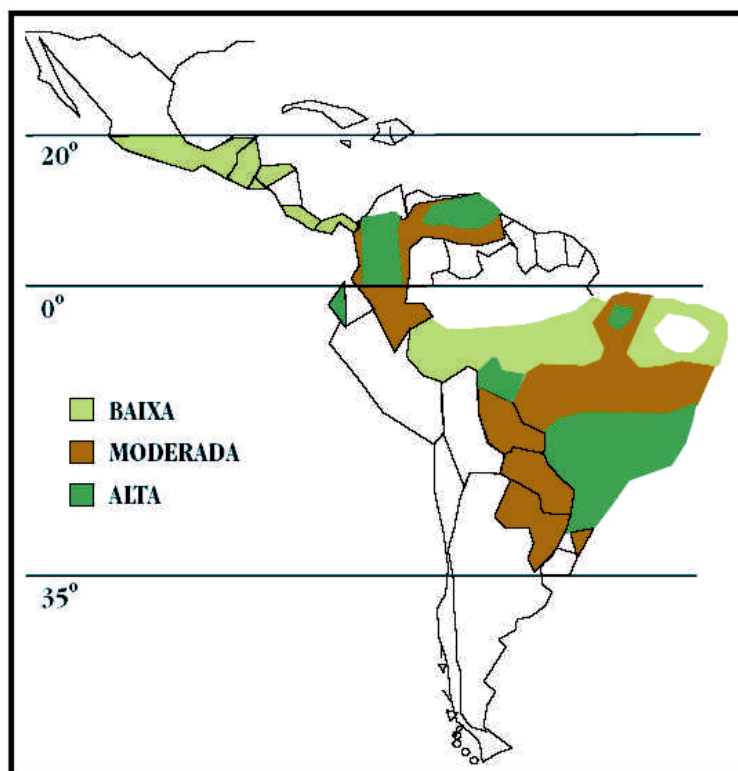


Figura 1: Distribuição geográfica da Paracoccidioidomicose (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006)

A real prevalência e incidência não podem ser calculadas, pois a PCM não é uma doença notificável e o local e as condições exatas em que o fungo ocorre na natureza ainda não estão bem determinados. Nos países onde a doença é endêmica, os casos não são distribuídos homogeneamente ao longo do território, mas tendem a se concentrar em torno das florestas úmidas (Restrepo, 1985).

Alguns casos autóctones já foram diagnosticados na Europa, nos Estados Unidos da América e na Ásia (Ajello & Polonelli, 1985). Estes relatos possibilitaram a determinação de um período assintomático da PCM, o qual é em média 15,3 anos, que ocorre após o contato do paciente com a área endêmica até a manifestação da doença (Brummer *et al.*, 1993). O longo período de latência, característico da PCM, dificulta o processo de determinação precisa do sítio onde a infecção ocorreu (Borelli, 1972).

Nas áreas endêmicas da doença a incidência estimada é de, aproximadamente, 1 a 3 casos clínicos para cada 100.000 habitantes por ano (Coutinho *et al.*, 2002). A PCM atinge preferencialmente trabalhadores rurais do sexo masculino, entre 30 a 50 anos de idade (Svidzinski *et al.*, 1999; Villa *et al.*, 2000). O trabalho com solo e plantações em área rural é fator ocupacional predisponente para a aquisição da PCM (Franco, 1987). A incidência da doença até à puberdade é a mesma em ambos os sexos, porém na fase adulta, mais de 90% dos pacientes são do sexo masculino (Martinez, 1997). Acredita-se que esse fato seja explicado pela ação protetora que os hormônios estrógenos conferem ao sexo feminino (Sano *et al.*, 1999), e pela ausência ou menor contato das mulheres com as fontes de infecção (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

I.3 – Homeostase de Cobre - Aspectos Gerais

Os metais cobre, ferro e zinco são micronutrientes essenciais e fundamentais para processos metabólicos. Os metais são cofatores para inúmeras enzimas e exercem papel estrutural em um grande número de proteínas. Entretanto, todos estes metais podem ser tóxicos, se os níveis de captação e distribuição não forem regulados, uma vez que o excesso

pode comprometer as funções celulares, gerando radicais livres, que são altamente destrutivos para as células (Peña *et al.*, 2000; Theil *et al.*, 2000; Eide *et al.*, 2003). Portanto, os organismos devem manter as concentrações citoplasmáticas de cobre, ferro e zinco em níveis não tóxicos, para que esses metais sejam apenas suficientes para o crescimento celular e participação em processos metabólicos vitais. Uma variedade de mecanismos homeostáticos já foram identificados e estudados e dentre eles, incluem-se o controle da transcrição de genes envolvidos na aquisição, distribuição e armazenamento desses metais (Rutherford & Bird, 2004).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido utilizada como organismo modelo eucariótico para os estudos dos mecanismos de regulação do transporte dos micronutrientes cobre, ferro e zinco. Estudos têm demonstrado que a captação de metais é mediada por dois sistemas de transportes específicos. Um sistema de alta afinidade é ativo em condições limitantes dos respectivos metais, o qual é regulado por fatores transcricionais metais-responsivos, que aumentam a expressão dos genes de transportadores quando as quantidades dos respectivos metais são limitadas. Um sistema de baixa afinidade ocorre e continua ativo, desempenhando sua função para manutenção da célula, mesmo quando a quantidade do metal é mais abundante. Estudos em *S. cerevisiae* identificaram um grande número de famílias de genes que atuam no transporte de metais, os quais apresentam homólogos que desempenham funções relacionadas nestes processos em mamíferos e vegetais (Van Ho *et al.*, 2002). A disponibilidade de cobre, ferro e zinco em tecidos vivos é mantida em níveis baixos o suficiente para restringir o crescimento de agentes patogênicos. Por exemplo, o corpo humano adulto contém aproximadamente 4,0g de ferro, de 3 a 5g de cobre e 2,3g de zinco (Papanikolaou & Pantopoulos, 2005).

Estudos vêm demonstrando a importância da autofagia em diversos processos biológicos, entre os quais podemos citar: adaptação, diferenciação e desenvolvimento celular. O envolvimento mais conhecido e bem descrito do processo de autofagia é no que se refere ao controle da homeostase de metais, visando à adaptação das células a nutrientes específicos e/ou na sobrevivência do organismo em condições de estresse (Onodera & Ohsumi, 2005). Todos os organismos têm mecanismos homeostáticos para assegurar que quantidades mínimas de metais essenciais estejam disponíveis para suas necessidades metabólicas e estudos realizados com o fungo filamentosso *Aspergillus fumigatus* indicaram que a autofagia é um desses mecanismos. Foi demonstrado que esse microrganismo quando cultivado na ausência de metais, mimetizando as condições do hospedeiro durante o processo infeccioso, apresentava deficiência no seu crescimento, condição em que o fungo passava a realizar processos autofágicos, reciclando proteínas associadas a metais pré-existentes. Dessa maneira ocorre a liberação de íons metálicos, deixando-os livres para utilização em processos metabólicos necessários para o crescimento do fungo e restabelecimento da homeostase. Vale ressaltar que quando acrescentados os metais zinco, ferro, manganês, magnésio e cobre aos meios de cultura pobres em micronutrientes, o crescimento do microrganismo foi normalizado (Richie *et al.*, 2008).

O cobre é um metal de transição capaz de atuar entre dois estados redox, Cu^{+2} oxidado e Cu^{+1} reduzido. A maioria dos organismos requer o cobre como um cofator importante para uma variedade de enzimas que realizam processos biológicos essenciais tais como respiração e crescimento celular, aquisição de ferro, proteção contra o estresse oxidativo, pigmentação (melanização) e outros processos biológicos complexos (Puig & Thiele 2002). O cobre em excesso no meio intracelular torna-se tóxico, pois reage com oxigênio, formando o radical

livre hidroxil, altamente destrutivo para a célula, causando danos aos lipídios, às proteínas e ao DNA. Conseqüentemente, os organismos desenvolveram mecanismos para o transporte de cobre na célula, visando manter as concentrações intracelulares em níveis não tóxicos (Marvin *et al.*, 2003). Em fungos, uma resposta comum das células às flutuações nos níveis de cobre é reprogramar a transcrição de genes que são importantes para a captura de cobre, de modo a manter as concentrações de cobre dentro dos limites homeostáticos, permitindo que a quantidade do mesmo seja suficiente para servir como cofator e impedindo sua acumulação em níveis citotóxicos (Beaudoin *et al.*, 2006).

Estudos realizados com cepas mutantes de *S. cerevisiae* permitiram propor um modelo do transporte de cobre de alta afinidade em células eucarióticas. Para o transporte, o cobre encontrado no meio extracelular na forma Cu^{2+} é reduzido a Cu^{+1} pelas redutases férricas de superfície celular, Fre1 e Fre2 (Georgatsou, *et al.*, 1997; Beaudoin *et al.*, 2007). A principal via de transporte desses íons através da membrana é realizada pelas proteínas transportadoras de cobre de alta afinidade (CTR's) (Dancis, *et al.*, 1994; Beaudoin *et al.*, 2007). É sugerido que os transportadores da família CTR possuem três domínios transmembrânicos, sendo a região amino-terminal extracelular, apresentando duas ou mais regiões ricas em metioninas, conhecidas como motivos "Mets". Estas regiões são organizadas como MxxM ou MxM e existem em número variável dentro da região amino-terminal. A porção carboxi-terminal seria intracelular, rica em aminoácidos carregados e apresentando uma região conservada de resíduos de histidina e cisteína. Um motivo MxxM, existe na segunda região transmembrana dos transportadores de cobre CTR1 e CTR3 de leveduras e mamíferos, sugerindo que o mesmo poderia coordenar a entrada de cobre durante transporte intramembranoso. Todas

essas características das duas regiões descritas são próprias das proteínas CTR's localizadas na membrana de fungos, vegetais e mamíferos (**Figura 2**) (Kim *et al.*, 2008).

As proteínas transportadoras de alta afinidade da família CTRs como, por exemplo: CTR1, CTR2 e CTR3 são funcionalmente redundantes, porém estruturalmente apresentam pouca homologia em nível de seqüência de aminoácidos (Beaudoin *et al.*, 2007). São proteínas integrais de membrana atuando como permeases competentes na captação de cobre na membrana plasmática, visto também que os genes codificantes de CTR1 e CTR3 são similarmente regulados em nível transcricional em resposta as concentrações de cobre no meio intracelular (Peña *et al.*, 2000; Beaudoin *et al.*, 2006).

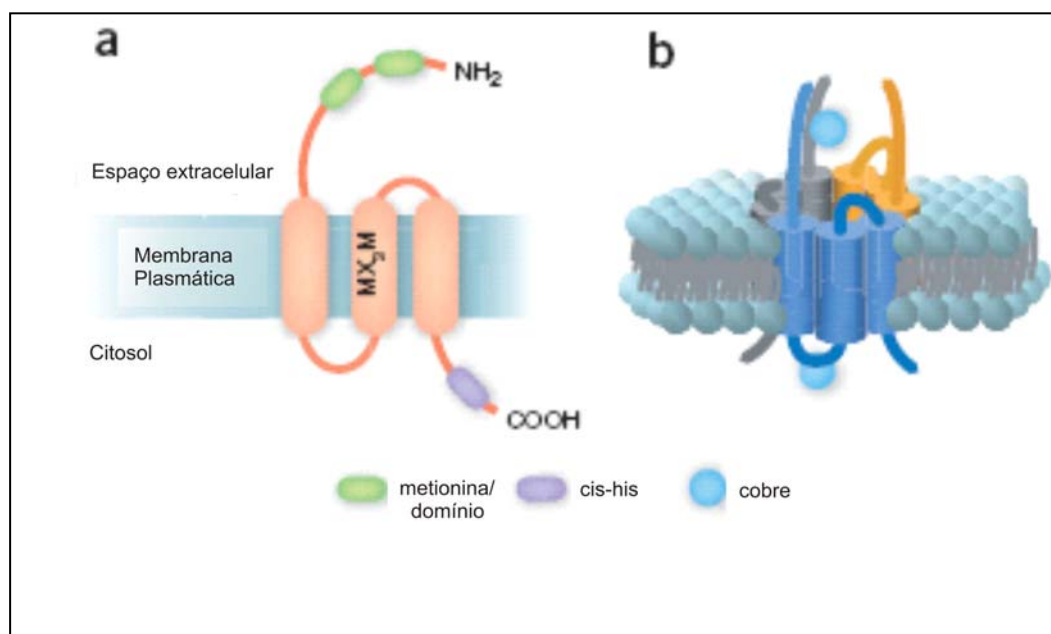


Figura 2: Modelo estrutural para os transportadores de cobre de alta afinidade. (A) - As proteínas CTR's apresentam geralmente aproximadamente 190 resíduos de aminoácidos, possuem dois domínios ricos em metionina (MxxM ou MxM, mostrados em verde) presentes na porção N-terminal extracelular, que tem a função de reforçar a absorção de íons cobre presentes no meio extracelular em condições de baixa concentração de Cu^{+1} na célula. Três domínios transmembrana (mostrados em laranja), tem motivo MX_2M , que possui função essencial durante o processo de importação do cobre. Um motivo rico em cisteína-histidina (mostrado em roxo),

típico das proteínas da família de transportadores de cobre, é presente na região C-terminal intracelular, responsável pela distribuição do cobre para o meio intracelular. **(B)** – Modelo do transportador de cobre CTR na bicamada lipídica proposto com base em análises de microscopia eletrônica e cristalografia, formando um homotrímero. Cada monômero é representado por uma única cor, com a região N-terminal projetada no exterior da célula captando cobre (demonstrado em esferas azuis). Os fosfolípidios componentes da membrana plasmática foram modelados em azul e cinza. Adaptação: Kim *et al.*, 2008.

Estudos têm demonstrado que pelo menos um membro da família CTR em *S. cerevisiae* não está localizado na membrana plasmática. Experimentos utilizando-se imunofluorescência indicaram que as proteínas CTR2 de leveduras estão localizadas em vacúolos. Foi verificado que CTR2 é necessária para a manutenção da homeostase de cobre, uma vez que quando o mesmo encontra-se em excesso no meio intracelular, o transportador CTR2 tem por função armazená-lo em vacúolos, de modo a manter o equilíbrio. Quando acontece o inverso, CTR2 torna-se também necessário, uma vez que é responsável pelo fornecimento de cobre para as cuproenzimas em condições de escassez do metal. Um homólogo ao CTR2, denominado CTR6, foi identificado em *Schizosaccharomyces pombe*, onde o mesmo foi funcionalmente caracterizado como transportador vacuolar de cobre (Bellemare *et al.*, 2002; Petris, 2004; Rees *et al.*, 2004; Rees *et al.*, 2007). As proteínas CTR1 e CTR3 estão localizadas na membrana plasmática de *S. cerevisiae*, responsáveis pela captura extracelular de cobre, enquanto CTR2 transporta e armazena o mesmo em vacúolos, sendo importante para os processos de detoxificação da célula e liberação do íon durante carência do metal para as proteínas cobre-dependentes (**Figura 3**) (Petris, 2004).

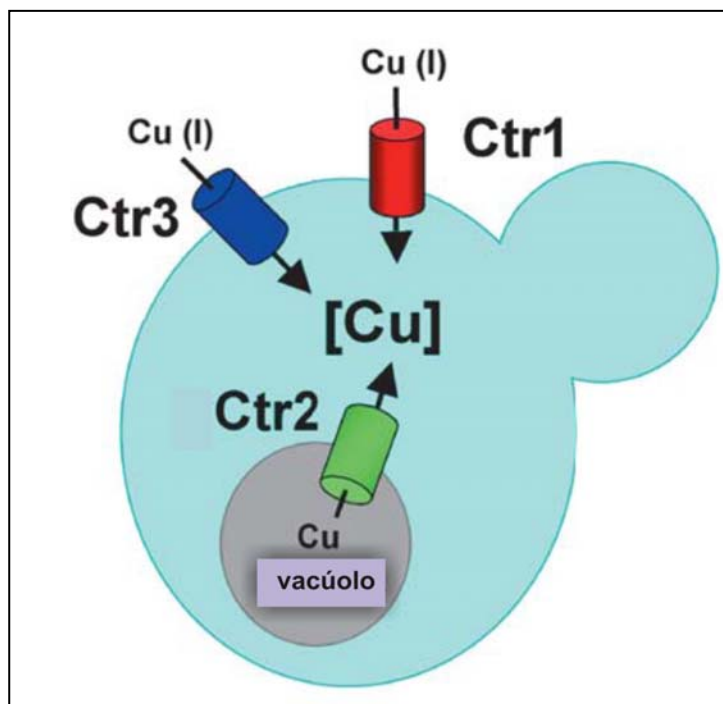


Figura 3: Modelo da localização celular das proteínas transportadoras de cobre de alta afinidade (CTR's) proposto para *S.cerevisiae*. Os transportadores CTR1 e CTR3 provavelmente estão localizados na membrana plasmática e são envolvidos na captação de íons cobre no meio extracelular, por alta afinidade. O transportador CTR2 está localizado no citosol e na membrana de vacúolos, exercendo a função de armazenar cobre em excesso nos compartimentos vacuolares e fornecer o mesmo quando seus níveis encontram-se limitantes. CTR2 é descrito como homólogo do transportador vacuolar CTR6 de *S. pombe*. Adaptação: Petris, 2004.

Em *S. cerevisiae* e *S. pombe* foi demonstrado que o transporte de cobre está intimamente relacionado à proteína CTR3, visto que mutações realizadas em resíduos de cisteína distribuídos ao longo da cadeia polipeptídica e mais concentrados na região carboxi-terminal, inativaram funcionalmente a proteína, ocasionando uma deficiência no nível de cobre no meio intracelular (Beaudoin *et al.*, 2006; Beaudoin *et al.*, 2007). A substituição de todos os motivos Mets localizados na porção amino-terminal, prejudicou gravemente a

captação de cobre através das proteínas CTRs 3, sugerindo que esta região possa servir como ligante do cobre extracelular (Puig *et al.*, 2002; Petris, 2004).

Um fator de transcrição que responde ao cobre (*cuf1*) e um transportador de cobre (CTR4) foram descritos em *Cryptococcus neoformans* (Waterman *et al.*, 2007). A deleção de *cuf1* resulta em redução na atividade da lacase, deficiência no crescimento em meio com baixo teor de cobre e expressão atenuada de CTR4, sob limitação de cobre. Também o mutante *cuf1* mostrou disseminação reduzida ao cérebro em modelo murino de criptococose (Waterman *et al.*, 2007). Experimentos com microarranjos de DNA também indicam que genes para a homeostase de cobre podem ser controlados pela rede regulatória de ferro em *C. neoformans* (Jung *et al.*, 2006).

Patógenos devem competir por níveis reduzidos de nutrientes quando atingem os tecidos do hospedeiro, de modo a desempenhar com sucesso o processo infeccioso. Apesar de o ferro ter sido bem caracterizado como um fator determinante na virulência bacteriana e fúngica, estudos recentes indicam que o metal exerce um papel crítico e fundamental como determinante para a virulência de fungos como *C. neoformans* e *Candida albicans*, durante o estabelecimento da infecção. Em camundongos infectados com cepas de *C. neoformans* mutantes para o gene *cuf1* não foram capazes de estabelecer a meningite, porque a transcrição do transportador de cobre CTR4 foi suprimida e o cérebro é um tecido onde os níveis do metal são baixos (Waterman, 2007; Kim *et al.*, 2008).

No fungo *C. albicans* têm-se descrito que o mecanismo para regulação da captação de cobre tem se distinguido do já anteriormente proposto para *S. cerevisiae*. Ambos os organismos apresentam o fator de transcrição *Mac1p*, responsável pela ativação da transcrição do transportador de cobre de alta afinidade CTR1. Em *C. albicans* *CaMac1p* é auto-regulado

por níveis de cobre, ao contrário do gene *Mac1p* de *S. cerevisiae* que é constitutivamente transcrito. Também foi descrito regiões *CuREs* (elementos de resposta ao cobre) presentes nas sequências de *Cactr1* e *CaMac1*, regiões essas responsáveis pela identificação dos níveis do metal presentes no meio intracelular. *CaMac1p* também foi descrito como fator envolvido na regulação da transcrição ferro-responsiva (Marwin *et al.*, 2003; Marwin *et al.*, 2004; Woodacre *et al.*, 2008).

Os íons cobre ao atravessarem a membrana plasmática são captados por pequenas proteínas solúveis que promovem o tráfego do cobre até o seu alvo, conforme modelo proposto por Kim *et al.*, 2008, para *C. neoformans* (**Figura 4**). Esse modelo da via de captação, distribuição, armazenamento e utilização de cobre, provavelmente é o mesmo para outros fungos, assim como para vegetais e mamíferos. O cobre presente no meio extracelular (Cu^{+2}) é reduzido pelas reductases FRE para Cu^{+1} e transportado pelas proteínas de alta afinidade CTRs. No meio intracelular o cobre, poderá ser captado pela metalochaperona ATX1 que o transporta até a proteína CCC2 ($\text{Cu}+\text{ATPase}$), que em *S. cerevisiae* entrega o cobre à via secretória e participa provavelmente nos processos de detoxificação da célula, se dirigindo até o vacúolo onde é acumulado o excesso de cobre. CCC2 também se localiza na membrana do Aparato de Golgi, sendo assim responsável pela distribuição de íons cobre que serão incorporados à cobre-proteínas/cuproenzimas recém-sintetizadas. A multicobre ferroxidase FET3 (Ferro- O_2 -oxidoreductase 3) atua conjuntamente com a proteína FET1; as duas são responsáveis pelo transporte de íons ferro reduzidos através da membrana plasmática em *S. cerevisiae*. Por esse motivo, existe uma intrincada associação entre o mecanismo de captura de ferro e a disponibilidade de cobre. Outro processo importante está relacionado com a detoxificação de cobre na célula. Em *S. cerevisiae* o principal mecanismo é mediado pelo

produto do gene *Cup1*, que codifica uma metalotioneína que sequestra esse íon no interior da célula e permite que essa resista a níveis mais altos de cobre (Hamer, *et al.*, 1985). Outro mecanismo descrito para suportar altos níveis de cobre no ambiente intracelular está relacionado com o armazenamento desse íon em organelas, conforme descrito em *S. pombe* (Hamer, 1986).

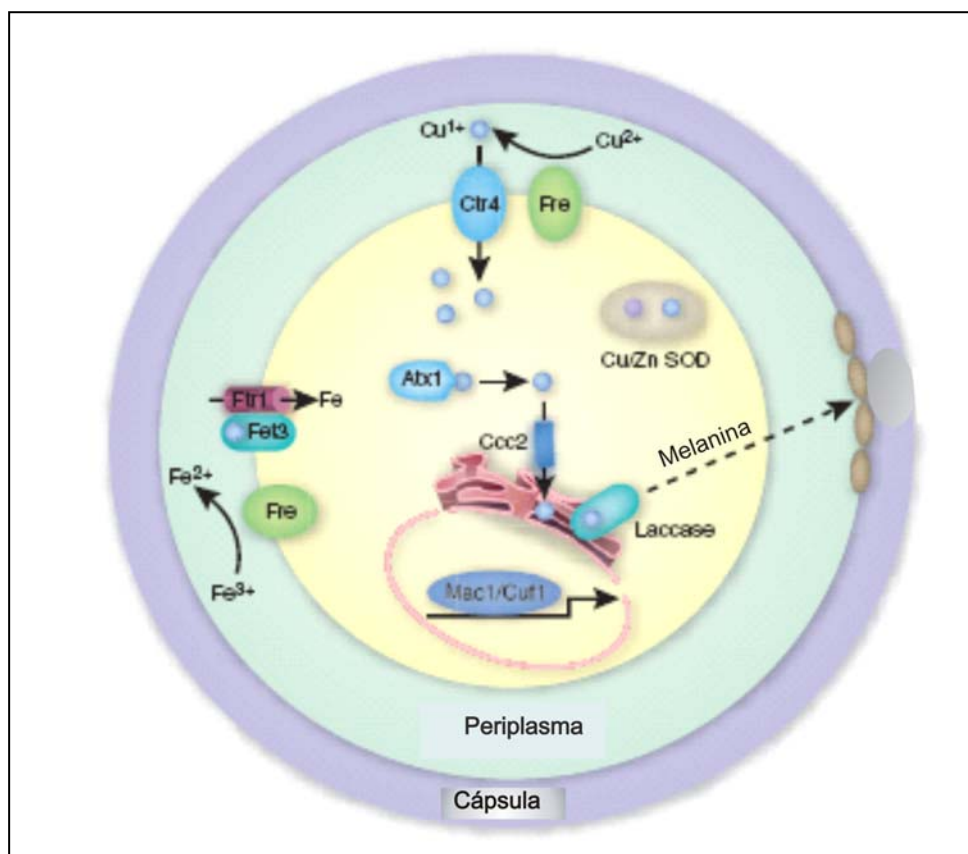


Figura 4: Modelo proposto para manutenção da homeostase de cobre no patógeno humano *C. neoformans*.

O cobre extracelular é reduzido pelas metaloredutases Fre de Cu^{2+} para Cu^{+1} , sendo transportado posteriormente pela proteína Ctr4. No meio intracelular o cobre é captado pela molécula Atx1 e entregue para o transportador Ccc2, localizado na membrana de organelas secretoras, fornecendo cobre para cuproenzimas, incluindo a

multicobre ferroxidase Fet3 que, juntamente com a permease Ftr1, medeia a absorção de alta afinidade do ferro. Íons de cobre são incorporados pela enzima lacase, que está envolvida na síntese de melanina. O fator de transcrição *Cuf1/Mac1* regula a expressão de moléculas transportadoras de cobre CTRs durante a homeostase ou deficiência do metal. Íons livres no citosol são incorporados por enzimas cobre-dependentes, como por exemplo, a superóxido dismutase. Adaptação: Kim *et al.*, 2008.

Para garantir a homeostase celular e proteger contra danos oxidativos, os organismos aeróbicos apresentam alguns sistemas de defesa antioxidante enzimáticos (peroxidases, superóxido dismutases e catalases) que reagem com as ROS (espécies reativas de oxigênio) e impedem que estas promovam a oxidação dos componentes celulares (Scandalios, (2002); Wong *et al.*, 2006). Nos processos de fagocitose de microorganismos patogênicos as células do sistema imunológico também produzem ROS e a capacidade do patógeno de se proteger destas moléculas pela formação de antioxidantes determina o curso da infecção (Giles *et al.*, 2006). Uma das alternativas encontradas por microrganismos é a produção de enzimas cobre/zinco superóxido dismutases, enzimas cobre-dependentes que estão presente na maioria das células humanas, bem como em células fúngicas, protegendo o patógeno dos danos da oxidação, causados pela defesa do hospedeiro. O cobre tem um papel antioxidante essencial através da ação da superóxido dismutase contra o estresse oxidante, ajudando a neutralizar os radicais livres que poderiam causar danos celulares graves. Experimentos realizados com uma cepa virulenta de *Salmonella entérica* identificaram que a mesma durante o processo de infecção, produzia duas Cu/Zn-superóxido dismutase (SODCI e SODCII), para reforçar os mecanismos de defesa contra as barreiras impostas pelo hospedeiro (Wood *et al.*, 2008).

As lacases são enzimas cobre-dependentes (multicobre oxidases), envolvidas na via de biossíntese de melanina em fungos, sendo dependentes de cobre para sua atividade. É descrito que a síntese de melanina é regulada por cobre, ferro, e baixas concentrações de glicose (Alspaugh *et al.*, 1997; Walton *et al.*, 2005). Walton e colaboradores (2005) analisaram a mudança de fenótipo de 19 mutantes de *C. neoformans*, com o objetivo de identificar genes envolvidos na biossíntese de melanina. Dentre os genes mutados, encontraram-se homólogos para os genes *ccc2* (transportador de cobre) e para a metalochaperona *atx1*. Os mutantes foram analisados após a adição de CuSO_4 exógeno ou após a remoção dos íons de cobre e ferro do meio com um quelante específico. Os resultados mostraram que na adição de cobre, todos os genes mutantes foram capazes de produzir melanina e durante a remoção de cobre nenhum mutante foi capaz de sintetizar melanina, sugerindo que, assim como em humanos, a homeostasia do cobre também é requerida em fungos e que as lacases, o transportador CCC2 e a metalochaperona ATX1, poderiam atuar entregando íons cobre para ferro oxidases.

Outra importante enzima cobre-dependente, é a cobre amino oxidase (CAO - Copper amine oxidase - EC 1.4.3.6.), grupo de enzimas que contêm cobre e foram identificadas em bactérias, leveduras, plantas e animais. Ainda pouco se sabe sobre as suas funções biológicas, porém existem evidências do seu envolvimento no metabolismo ou desintoxicação de xenobióticos, na oxidação de diversos substratos aminas, fornecendo fontes de carbono e nitrogênio para o crescimento celular, principalmente de fungos (Samuels & Klinman, 2005). Foram demonstrados que CAOs apresentam um único íon cobre por monômero (Laliberté *et al.*, 2005). Estudos realizados por Peter e colaboradores (2008), demonstraram que uma mutação sítio dirigida em três resíduos de histidina na região amino terminal da CAO1 de *Schizosaccharomyces pombe*, afetou a atividade da enzima e a transcrição dos genes *ctr4*, *ctr5*

e *cuf1*, todos envolvidos no metabolismo de cobre, sugerindo que CAO1 exige a presença dos mesmos funcionalmente ativos.

Para melhor entender a resposta de fungos a condições de estresse à cobre, estudos tem sido conduzidos com o intuito de elucidar a importância e os mecanismos utilizados pelos fungos para suportar a ausência ou excesso desses íons. Exemplo desse tipo de trabalho foi o realizado por Rustici e colaboradores (2007) em *S. pombe* e em *S. cerevisiae*. Os resultados obtidos indicam um padrão de transcrição diferenciado durante o crescimento do fungo em condições de depleção de cobre. Dentre os genes diferencialmente transcritos nessas circunstâncias estão àqueles envolvidos na captura de cobre e genes envolvidos no processo de respiração celular, provavelmente pela dependência de cobre como cofator de enzimas envolvidas nesse mecanismo.

I.4 – Transportador de cobre de alta afinidade (*ctr3*): um gene diferencialmente expresso em *P. brasiliensis*.

Estudos de perfis de expressão gênica de patógenos têm sido utilizados para a elucidação de estratégias de adaptação, sobrevivência e virulência de microrganismos durante o processo infeccioso. Com o propósito de identificar genes possivelmente envolvidos na adaptação e sobrevivência de *P. brasiliensis* no hospedeiro durante a infecção, Bailão *et al.* (2006), utilizaram a técnica de 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 hematogênica de disseminação fúngica. Foi observada alta

freqüência do transcrito *ctr3*, codificando um transportador de cobre de alta afinidade. O transcrito *ctr3* foi identificado como um dos cDNAs mais abundantes em células leveduriformes derivadas de infecção em fígado de camundongos, o que reforça seu possível papel no processo infectivo (Costa *et al.*, 2007).

Muitos organismos patogênicos desenvolveram estratégias complexas para a aquisição de ferro e em muitos deles a disponibilidade desse elemento é um sinal para a indução de expressão de fatores de virulência (Timm *et al.*, 2003). Ferro é usualmente presente na forma férrica, complexado com ligantes no ambiente (Askwith *et al.*, 1996). Embora os mecanismos de aquisição de ferro por *P. brasiliensis* ainda não sejam esclarecidos, dados transcricionais sugerem prováveis estratégias para a captação de ferro pelo fungo. Dessa maneira, estudos realizados em nosso laboratório por Bailão *et al.* (2006), sugerem que o fungo não seja capaz de captar ferro na forma insolúvel, o qual deve ser inicialmente solubilizado por conversão para a forma ferrosa pela redutase férrica codificada pelo gene *fre2*. Quando a disponibilidade de ferro é baixa, como suposto ocorrer nos tecidos do hospedeiro, *P. brasiliensis* utilizaria um sistema de captação de alta afinidade que compreende uma permease de membrana ZRT1 (*high-affinity zinc/iron transporter*) e uma oxidase multi-cobre, ambas identificadas em análises transcricionais. Dessa maneira, a captação redutiva de ferro requer também a captação de cobre mediada por uma permease codificada pelo gene *ctr3*, a exemplo de outros microrganismos (Bailão *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2007).

JUSTIFICATIVA

II – Justificativa

A disponibilidade de micronutrientes nos tecidos do hospedeiro é mantida a níveis baixos de forma a restringir o crescimento de patógenos. O fato de que a concentração disponível de micronutrientes, como cobre, para microrganismos patogênicos é mantida abaixo da quantidade requerida para o seu desenvolvimento, determina que a habilidade em se obter esses micronutrientes do hospedeiro defina, em grande parte, características de virulência.

Estudos prévios do laboratório demonstraram que o transportador de cobre de alta afinidade (*PbCTR3*) é uma molécula altamente expressa em condições que mimetizam o processo infectivo. Em função desse resultado inicial, tornou-se atraente a realização de estudos adicionais visando à caracterização do transcrito *ctr3*, bem como a análise da expressão de genes envolvidos na captação de cobre em condições que mimetizam a restrição de cobre durante o processo infeccioso nos tecidos do hospedeiro.

OBJETIVOS

III – Objetivos

Em função do exposto, foi proposto no presente trabalho a caracterização do transportador de cobre de alta afinidade (*PbCTR3*) e de genes relacionados à manutenção da homeostase de cobre em *P.brasiliensis*. As metas experimentais foram:

- Clonagem molecular e caracterização do gene codificante para o transportador de cobre de alta afinidade (*PbCTR3*);
- Rastreamento e identificação *in silico* de genes relacionados à manutenção da homeostase de cobre 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 cobre em *P.brasiliensis*, em condições de restrição de cobre e ferro;
- Análises por PCR em tempo real do perfil de expressão dos genes envolvidos no metabolismo de cobre, a partir de RNAs extraídos de células leveduriformes de *P.brasiliensis* derivadas de órgãos de animais infectados.

METODOLOGIA

IV– Materiais e Métodos

IV. 1 – Fluxograma.

O fluxograma dos experimentos realizados no trabalho é apresentado na **figura 5**.

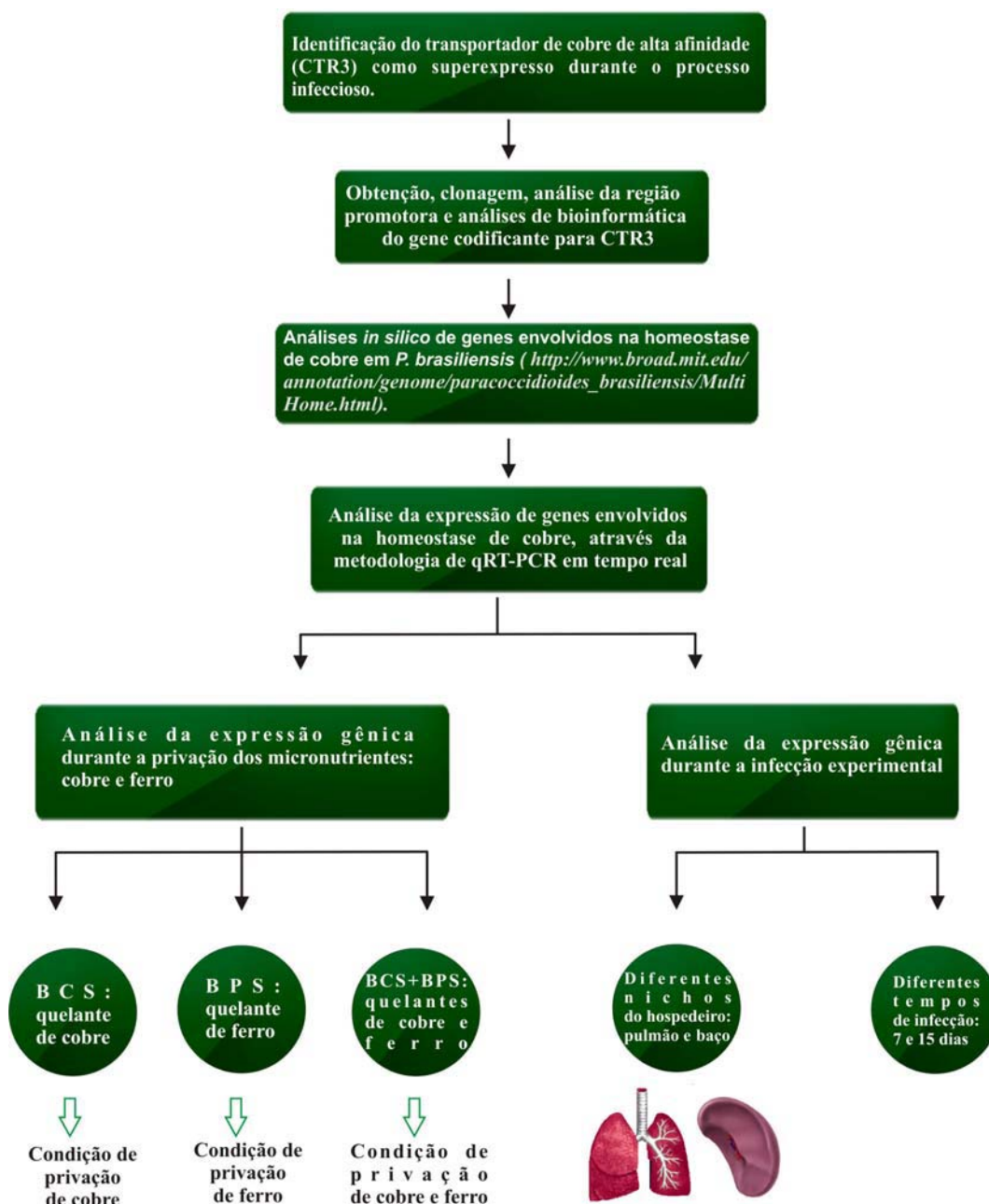


Figura 5: Fluxograma representativo das metas experimentais realizadas neste trabalho

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. O fungo foi cultivado e mantido em meio de cultura Fava-Netto por 7 dias (Fava-Netto, 1955) na temperatura de 36°C para a forma leveduriforme e 22°C para a forma miceliana, durante 14 dias.

IV. 3 – Obtenção do cDNA e gene codificantes para o transportador de cobre de alta afinidade (*PbCTR3*).

Na análise representacional diferencial (RDA) de genes de *P. brasiliensis* induzidos durante o processo infectivo e em condições que mimetizam a via hematogênica de disseminação fúngica foi identificado o cDNA completo codificante para um transportador de cobre de alta afinidade (*PbCTR3*) (Bailão *et al.*, 2006). Recursos computacionais foram utilizados para a análise das seqüências de nucleotídeos e deduzida de aminoácidos. A seqüência resultante foi depositada no banco de dados público do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), sob o número de acesso: DQ534496.

A partir da seqüência de nucleotídeos do cDNA codificante para *PbCTR3*, obtido pela estratégia de análise de diferença representacional (cDNA-RDA), foram desenhados oligonucleotídeos (**Tabela 1**), com a finalidade de se amplificar o fragmento genômico codificante de *PbCTR3*, via reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se DNA total de *P. brasiliensis*. O sistema de amplificação continha: 0,5µL dos oligonucleotídeos (**Tabela 1**) na concentração de 50 µM; 1,0µL de DNA total de *P. brasiliensis* na concentração de 100ng/µL; 2,0 µL de dNTPs na concentração de 2,5 mM cada; 0,25µL de Taq DNA

Polimerase na concentração de 5U/ μ L; 2,5 μ L de tampão 10 X para Taq DNA Polimerase; 0,75 μ L de MgCl₂ a 25 mM e água suficiente para um volume final de 25 μ L. O DNA molde foi desnaturado a 94°C por 2 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 seg, anelamento a 58°C por 30 seg e extensão por 40 seg a 72°C. Uma extensão final a 72°C foi realizada. Obteve-se desta forma um fragmento genômico de 1655pb. As amplificações foram realizadas no termociclador (Perkin Elmer/Gene Amp PCR System 2400) e a análise dos produtos da reação foi feita através de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com 1 μ g/mL de brometo de etídeo. A visualização do gel foi feita em transluminador de luz ultravioleta. Os fragmentos de DNA a serem eluídos foram separados por eletroforese em gel de agarose.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene codificante para *PbCTR3*

<i>Oligonucleotídeos</i>	<i>Seqüência</i>	<i>*TM °C</i>
<i>S-ctr3</i> (sense)	5'- GAG CTC ATG GAT ATG CAT ATG GCG - 3'	58°C
<i>AT-ctr3</i> (anti-sense)	5'- AAG CTT CTA ACC GCA ACA GAC AGT - 3'	58°C

* TM: Temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos.

Os fragmentos de DNA foram cortados do gel e transferidos para microtubos tipo “Eppendorf” para eluição, utilizando o sistema comercial GFX PCR DNA (GE, Healthcare[®]). A amostra eluída foi quantificada em gel de agarose 0,8% e no aparelho Genequant (GE, Healthcare[®]).

O produto amplificado de 1.655pb, após purificação, foi clonado no vetor TOPO TA (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA) seguindo-se os métodos descritos no protocolo do fabricante. A razão molar da concentração de DNA do vetor e do inserto foi de 1:4. O sistema de ligação com volume final de 6µL foi composto de: 4,0µL do inserto; 1,0µL de solução de sal; 1,0µL de vetor TOPO TA. O sistema foi incubado a 22°C por 30 min e mantido a 4°C. Ao final da reação de ligação foi realizada a transformação do vetor em células competentes de *Escherichia coli*, linhagem *DH5α*, conforme descrito por Sambrook *et al.*, (1989). O sistema de transformação foi constituído de 200µL de células competentes e 4µL do sistema de ligação. O material foi incubado em gelo por 45 min e seguiu-se um choque térmico à temperatura de 42°C por 1 min e 15 seg. Imediatamente as células foram retornadas ao gelo. Adicionou-se ao sistema 300µL de meio Lúria-Bertani (LB) líquido (triptona 10g, NaCl 10 g , extrato de levedura 5 g , água destilada (q.s.p.) 1.000 mL , pH 7,0), incubando-se sob lenta agitação, a 37°C, por 1 h, com a finalidade de se recuperar as células transformadas. Após este período, o sistema foi semeado em placas de Petri contendo meio LB Ágar (Este meio foi preparado conforme o LB descrito anteriormente, adicionando-se apenas 2% de ágar). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16h. Para confirmação da clonagem, colônias selecionadas foram submetidas à reação de PCR e os produtos analisados em gel de agarose 0,8% .

IV. 4 – Seqüenciamento de DNA.

Foram selecionados para o seqüenciamento no aparelho MEGABACE® (GE, Healthcare®) quatro clones com o plasmídeo TOPO TA contendo o gene *Pbctr3*. O

seqüenciamento foi realizado segundo o método descrito por Sanger *et al.* (1977), utilizando-se o sistema “DYEnamic ET, Dye Terminator Cycle Sequencing”. As reações de seqüenciamento foram preparadas utilizando-se 4 µl do reagente DYEnamic ET terminator, 1 µl de oligonucleotídeos (5µm), oligonucleotídeos iniciadores M13 Forward (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'), M13 Reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), T7 (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'), *ctr3*-sense (5'-GAGCTCATGGATATGCATATGGCG - 3') e *ctr3*-anti-sense (5'- AAGCTTCTAACCGCAACAGACAGT - 3'), 1µL de DNA do clone selecionado e água para volume final de 10 µl. As reações foram realizadas, via PCR, em 35 ciclos nas condições: 95°C por 2 seg; 95°C por 10 seg ; 50°C por 15 seg e 60°C por 1 min. As amostras contendo o DNA amplificado foram precipitadas com acetato de amônia, etanol 100%, lavadas com etanol 70% e ressuspendidas em 10 µl de tampão contendo formamida.

IV. 5 – Análises de Bioinformática.

As seqüências de DNA obtidas foram processadas utilizando-se o programa PHRED (Ewing e Graden, 1998; Ewing *et al.*, 1998) com finalidade de se retirar o vetor e formar contigs, formando-se assim a seqüência completa. Em seguida, as pesquisas de similaridade das seqüências de proteínas e de nucleotídeos foram feitas no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando-se o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990). O alinhamento entre as seqüências homólogas foi feito através do programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997), e os motivos na seqüência deduzida de proteínas foram analisados

pelo programa PROSITE (www.expasy.org/prosite) (Hofmann *et al.*, 1999). A seqüência genômica completa de *Pbctr3* foi depositada no banco de dados público do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), sob o número de acesso: EU530695. A região promotora do gene *Pbctr3* foi analisada utilizando-se o algoritmo Scan Promotor (<http://www-bimas.cit.nih.gov/cgi-bin/molbio/proscan>), com base na seqüência depositada no Banco de dados do genoma estrutural de *P. brasiliensis* (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html).

IV. 6 – Rastreamento e identificação *in silico* de genes relacionados à manutenção da homeostase de cobre em *P. brasiliensis*.

O rastreamento e a identificação dos genes envolvidos no metabolismo de cobre foram realizados no banco de dados do Broad Institute of MIT and Harvard (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html), onde 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 cobre em *S. cerevisiae*, foram obtidas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul *et al.*, 1997), e comparadas com o banco do genoma estrutural de *P. brasiliensis*, para a obtenção de genes homólogos nos três isolados de *P. brasiliensis*. As seqüências identificadas foram utilizadas para elaboração de um modelo presumivelmente utilizado pelos isolados na manutenção da homeostase de cobre.

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

Para os experimentos de depleção de cobre e ferro, 2×10^8 leveduras de *P. brasiliensis* foram removidas de meio sólido Fava-Neto (Fava Neto, 1955), e transferidas para meio mínimo líquido McVeigh & Morton (MMcM) – Modificado (Restrepo & Jiminez, 1980) (Tabelas: 2, 3 e 4) adaptado para as condições de restrição de cobre e ferro (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 cobre continha células leveduriformes em meio mínimo MMcM na presença de um agente quelante específico de cobre (**BCS**: batocuproinadisulfonato sódico). 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) e a condição de depleção de cobre e ferro continha células leveduriformes em meio mínimo MMcM na presença dos dois agentes quelantes **BCS** e **BPS**. Os quelantes de cobre e ferro foram adicionados na concentração final de $50 \mu\text{M}$. As células leveduriformes foram crescidas por um período de 3h em uma agitação de 200rpm a temperatura de 36°C .

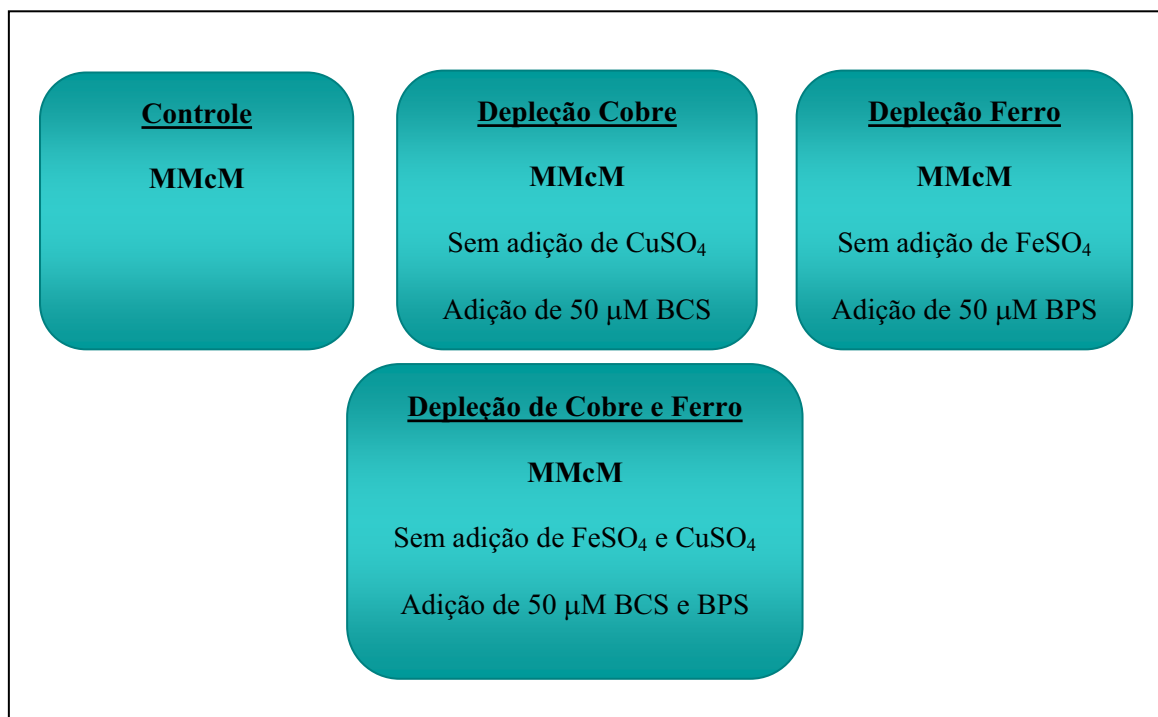


Figura 6: Condições de crescimento de *P. brasiliensis* durante privação de cobre e ferro.

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

Glicose	10g
Fosfato de Potássio Monobásico (KH_2PO_4)	1,5 g
Sulfato de Magnésio Hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
Cloreto de Cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	0,15 g
Sulfato de Amônia (NH_4SO_4)	2,0 g
L-asparagina	2,0 g
L-cistina	0,2 g
Solução de vitaminas [#]	10 mL

Solução de elementos traços #	1 mL
Água bidestilada q.s.p.	1.000 mL

* 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 em água por aquecimento, onde gotas de NaOH 1M foram adicionadas até completa dissolução e logo após adicionada ao meio de cultura.

Tabela 3 - Solução de Vitaminas #

Tiamina	6,0 mg
Niacina	6,0 mg
Pantotenato de Ca	6,0 mg
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 ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$)	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

* Os componente sulfato de cobre foi adicionado somente nos meios que não contêm BCS e o componente sulfato ferroso foi adicionado somente nos meios que não contêm BPS.

Após incubação em meio com privação dos micronutrientes cobre e ferro, as células foram coletadas por centrifugação. Os precipitados formados foram lavados com PBS 1X estéril para 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. 8 – Infecção Experimental

A infecção experimental em camundongos por *P. brasiliensis* foi realizada como descrito previamente por Bailão *et al.* (2006) com algumas modificações. Doze fêmeas de camundongos Balb/c foram infectadas por via intranasal com 1×10^7 células leveduriformes, destes animais foi realizado o isolamento do fungo de pulmão e doze fêmeas de camun-

camundongos Balb/c foram infectadas por via intraperitoneal com 1×10^7 células leveduriformes, destes animais foi isolado o fungo do baço, mimetizando assim a via de infecção em humanos. Os camundongos foram sacrificados 7 e 15 dias após a infecção. Três animais foram utilizados como controle e foram inoculados com tampão fosfato estéril PBS (Concentração [mM], concentração g/L: Na_2HPO_4 10 mM 1,189g; KH_2PO_4 2 mM 0,2g; NaCl 137 mM 8,0g; KCl 2,7 mM 0,2g; água destilada q.s.p. 1,0 L; pH 7,2 - 7,4). Os órgãos (pulmão e baço) foram removidos, macerados e homogeneizados em 5 mL de PBS. Um volume de 100 μ l do macerado foi plaqueado em meio BHI ágar suplementado com 1% de glicose. As placas foram incubadas a 36°C e após 17 dias foram utilizadas para extração de RNA. O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol, seguindo os procedimentos indicados pelo fabricante (InvitrogenTM, Life Technologies, Carlsberg, CA).

IV. 9 – Extração de RNA (Trizol[®])

Todos os procedimentos envolvendo a manipulação de RNA 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 0,01%, durante 2 h. As cubas de eletroforese foram tratadas com peróxido de hidrogênio 3%, durante 30min. As soluções foram feitas com água previamente tratada com DEPC 0,01%.

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* obtidas dos experimentos de depleção de cobre e ferro, bem como as células derivadas de órgãos de animais infectados, durante infecção experimental, foram lavadas em PBS 1X estéril, pesadas e o trizol foi acrescido 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 3.000xg 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 3.000xg 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 3.000xg por 15 min. a 4°C. A fase aquosa foi recolhida e o RNA nela contido foi precipitado pela adição da solução de citrato de sódio 1,2M e cloreto de sódio 0,8M e de 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 3.000xg 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 3.000xg por 5 min a 4°C. O RNA resultante foi seco à temperatura ambiente por 10 min e ressuscitado em água tratada com DEPC 0,01%. O RNA foi quantificado por espectrofotometria, aliqotado e estocado a -80°C.

IV. 10 – Síntese de cDNA e análise da expressão gênica por qRT-PCR em Tempo Real

Os RNAs obtidos de células leveduriformes durante depleção de cobre e ferro e durante a infecção experimental, foram tratados com DNase 1U/μL (Fermentas) e utilizados para síntese de cDNAs utilizando-se a transcriptase reversa SuperScript II (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA) e oligonucleotídeo oligo(dT)₁₅, seguindo protocolo do fabricante. Os cDNAs foram utilizados em reações de qRT-PCR que foram realizadas utilizando-se a mistura SYBER green (Applied Biosystems, Foster City, CA) no sistema StepOnePlus™ real time PCR (Applied Biosystems Inc.). 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 e as seqüências utilizadas foram: Transportador de cobre de alta afinidade (*ctr3 sense* 5'-CATGTCATCAATGCCTGCTTC – 3', *ctr3 anti-sense* 5'- TGCAGG CGGGTCGGGAGA – 3'), Proteína responsiva ao cobre (*crp sense* 5'- CTTGTGGAGACCTAGTAGCA – 3', *crp anti-sense* 5'- GAATGAACATTGTGAGAAAAACG – 3'), Metalochaperona de cobre (*atx1 sense* 5'- CTCAAGAACTCGACGGAGT – 3', *atx1 anti-sense* 5'- TCAAACATCCTTCGGCTCGC – 3'), Transportador de cobre organelar (*ccc2 sense* 5'- CTAATCCCTCCGGAGAAAATC – 3', *ccc2 anti-sense* 5'- GCA TTCTCGACTGCGGAAGT – 3'), Superóxido dismutase (*Cu/Zn-sod sense* 5'- ACTGCGCAAGTTATGATGGAA – 3', *Cu/Zn-sod anti-sense* 5'- CACGGGAAGGGTCCATTTTC – 3'), Cobre amino oxidase (*cao sense* 5'- AGCCTTCAATCACCTGGA – 3', *cao anti-sense* 5'- TCGTGTGTCCTT CGCGAAAC –

3'), Proteína ribossomal L34 (*I34 sense* 5'- TCAATCTCTCCCGCGAATCC – 3', *I34 anti-sense* 5'- GGCGGAAGGGGGATGTGTT – 3'). A reação de PCR em tempo real foi realizada em 40 ciclos de 95°C por 15seg. e 60°C por 1min. A mistura SYBER Green PCR (Applied Biosystems) foi utilizada adicionada de 10 pmol de cada oligonucleotídeo e 40 ng de cDNA molde, em um volume final de 25µl. 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 $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

V– Resultados

V.1 – Clonagem e caracterização do cDNA e gene codificantes para o transportador de cobre de alta afinidade (*PbCTR3*) de *P. brasiliensis*.

A partir da técnica de análise representacional diferencial (RDA) de genes de *P. brasiliensis* diferencialmente expressos e induzidos durante o processo infectivo, foi identificado o cDNA completo codificante para um transportador de cobre de alta afinidade (CTR3) (Bailão *et al.*, 2006). A seqüência de cDNA foi comparada com outras depositadas em banco de dados. A seqüência completa do cDNA (**Figura 7**) apresentou um total de 1389 pares de bases, com 421 nucleotídeos não traduzidos na região 5' e 389 nucleotídeos não traduzidos na região 3'. A seqüência apresenta um único quadro de leitura aberto (ORF) com 582pb, codificando uma proteína de 193 aminoácidos com massa molecular predita de 21,5 kDa e ponto isoelétrico predito de 8,6. A comparação em banco de dados mostrou identidade com o gene codificante para CTR3. Em função destes resultados o cDNA passou a ser denominado de *Pbctr3*. A seqüência foi depositada em banco de dados (GenBank) sob o número de acesso DQ534496 (ver anexo).

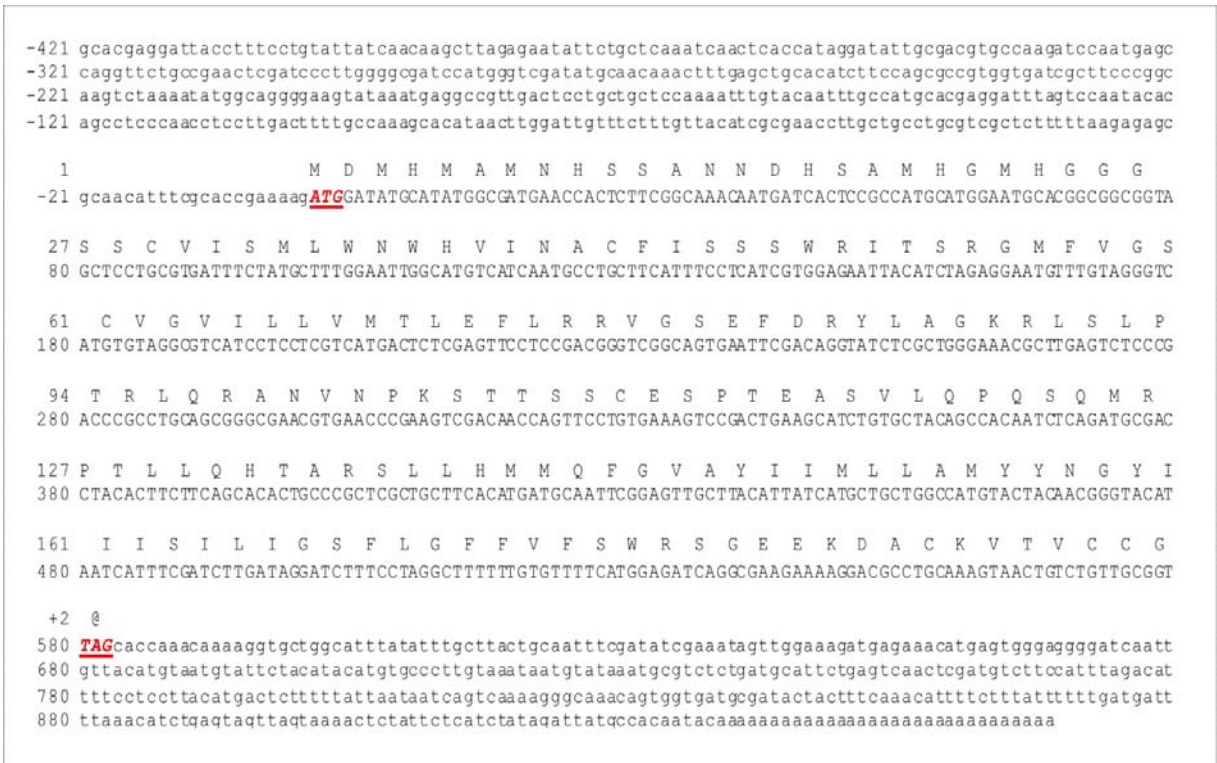


Figura 7: Sequência de nucleotídeos do cDNA e sequência deduzida de aminoácidos de *PbCTR3*. A sequência de nucleotídeos está na direção 5' → 3'. A Sequência deduzida de aminoácidos é mostrada em letras maiúsculas. Os códons de iniciação e de parada estão em vermelho, itálico e sublinhados. As numerações para nucleotídeos e aminoácidos estão à esquerda. As regiões 5'e 3' não traduzidas estão indicadas por letras minúsculas.

O DNA genômico total de *P. brasiliensis* foi amplificado, via PCR, com o objetivo de se obter um fragmento genômico codificante para CTR3. Para isso, foram construídos oligonucleotídeos *ctr3*-sense e *ctr3* anti-sense (**Tabela 1**) baseados na seqüência dos nucleotídeos do cDNA. O fragmento amplificado de 1.655pb, foi eluído do gel de agarose 0,8%, quantificado e em seguida o gene foi clonado no vetor TOPO TA e submetido à reação de seqüenciamento automático utilizando-se o aparelho MEGABACE™ (GE Healthcare).

A seqüência genômica foi obtida e comparada com o cDNA utilizando-se o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997). As análises revelaram um total de 1.655pb; a seqüência foi depositada no banco de dados (GenBank) sob o número de acesso EU530695 (ver anexo). O gene homólogo do *P. brasiliensis* contém quatro exons interrompidos por três íntrons, de 130, 82 e 85pb, respectivamente. Todas as seqüências intervenientes são flanqueadas por 5' *GT* e 3' *AG* (**Figura 8**). Com base na seqüência completa de nucleotídeos de *Pbctr3* depositada no banco do genoma estrutural de *P. brasiliensis* (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html), pode-se identificar a região promotora TATA Box, utilizando-se o algoritmo Promotor Scan (<http://www-bimas.cit.nih.gov/cgi-bin/molbio/proscan>).

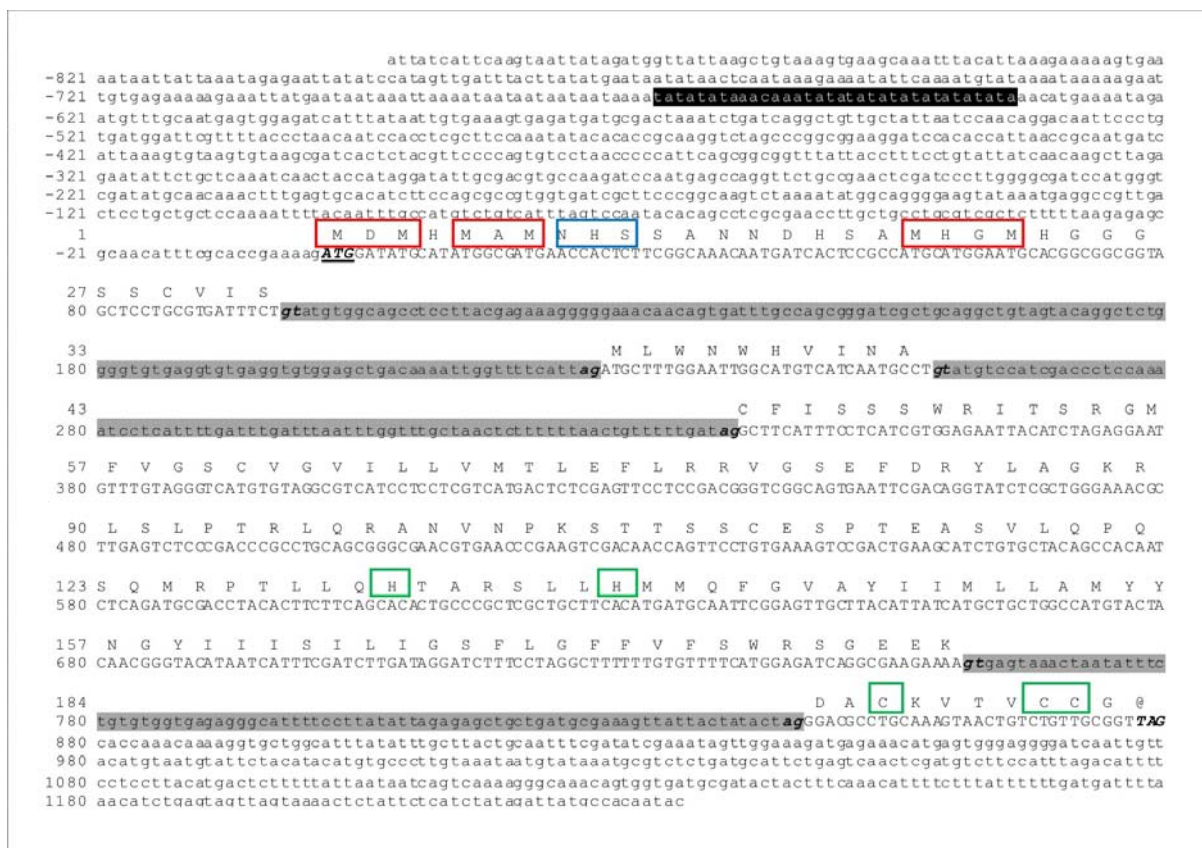


Figura 8: Seqüência genômica de *PbCTR3* e seqüência deduzida de aminoácidos. A seqüência de nucleotídeos está na direção 5' → 3'. A seqüência deduzida de aminoácidos é representada em letras maiúsculas. Os íntrons são representados por letras minúsculas e marcados em cinza, nucleotídeos em itálico e negrito representam a região conservada 5' → 3' consenso dos íntrons. Os códons de iniciação e de parada estão em negrito, itálico e sublinhados. A numeração da seqüência de aminoácidos inicia-se na metionina, codificando o códon de iniciação e termina no primeiro códon de terminação. As numerações para nucleotídeos e aminoácidos estão à esquerda. As regiões 5' e 3' não traduzidas estão indicadas por letras minúsculas (8-10) no quadrado azul representam um possível sítio de *N*-glicosilação. A seqüência *PbCTR3* apresenta a região amino-terminal rica em metioninas, representando os motivos “Mets” (MxM e MxxM), destacados em quadrados vermelhos e região carboxi-terminal apresentando motivos ricos em histidinas e cisteínas (quadrados verdes); esses motivos são comuns em todas as proteínas transportadoras de cobre da família CTR. Os motivos foram identificados através da utilização do programa PROSITE (<http://www.expasy.org/prosite>) (Hofmann *et al.*, 1999). A região promotora foi analisada utilizando-se o algoritmo Promotor Scan (<http://www-bimas.cit.nih.gov/cgi-bin/molbio/proscan>). A região promotora TATA Box está evidenciada em caixa preta.

V.2 – Análise comparativa da seqüência deduzida de aminoácidos de *PbCTR3* de *P. brasiliensis*

A seqüência de aminoácidos que codificam para *PbCTR3* foi comparada com outras seqüências depositadas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e no banco de dados de proteínas do Expasy (<http://www.expasy.org>). As análises computacionais revelaram identidade com CTR3 de *Ajellomyces capsulatus* (número de acesso no GenBank: ABF22674) , *Coccidioides immitis* (número de acesso no GenBank: XP001240196), *Aspergillus clavatus* (número de acesso no GenBank: XP001272812) (**Figura 9**). Análises baseadas no alinhamento de seqüências através do algoritmo Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) demonstraram que *PbCTR3* apresenta 63% de identidade e 73% de similaridade com CTR3 de *Ajellomyces capsulatus*, 55% de identidade e 66% de similaridade com CTR3 de *Coccidioides immitis*, 46% de identidade e 60% de similaridade com CTR3 de *Aspergillus clavatus* (**Tabela 5**).

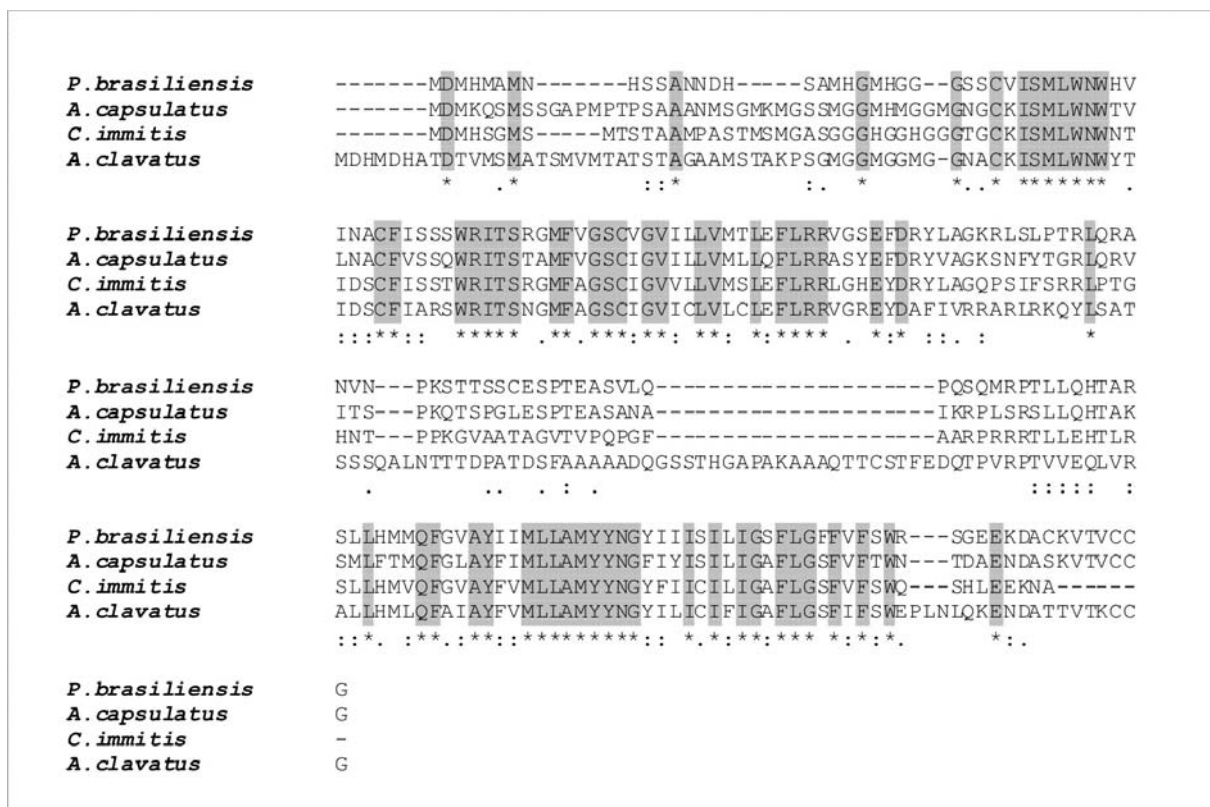


Figura 9: Alinhamento da seqüência deduzida de aminoácidos de *PbCTR3* com proteínas homólogas, após análise comparativa no programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990). As seqüências são: *P. brasiliensis* (número de acesso no GenBank: DQ534496); *A. capsulatus* (número de acesso no GenBank: ABF22674); *C. immitis* (número de acesso no GenBank: XP001240196); *A. clavatus* (GenBank accession number XP001272812). Posições de identidade completa são indicadas com asterisco (*), dois pontos (:) indicam substituições conservadas e um ponto (.) indica uma substituição semiconservada. As posições mais conservadas são marcadas com preenchimento em cinza.

Tabela 5 – Porcentagem de identidade e similaridade da seqüência de aminoácidos de *PbCTR3* e *CTR3* de diferentes organismos depositadas em banco de dados.

Microrganismo	Identidade (%)*	Similaridade (%)*
<i>A. capsulatus</i>	63%	73%
<i>C. immitis</i>	55%	66%
<i>A. clavatus</i>	46%	60%

* Porcentagens calculadas com base em alinhamento de duas seqüências (bl2seq) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>). As seqüências obtidas são: *P. brasiliensis* (número de acesso no GenBank: DQ534496); *A. capsulatus* (número de acesso no GenBank: ABF22674); *C. immitis* (número de acesso no GenBank: XP001240196); *A. clavatus* (GenBank accession number XP001272812).

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

O rastreamento inicial foi focado em genes descritos como envolvidos na manutenção da homeostase de cobre em *Saccharomyces cerevisiae*. Inicialmente as seqüências desses genes foram obtidas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul *et al.*, 1997) e utilizadas para o rastreamento de seqüências homólogas depositadas no banco de dados do genoma estrutural de *P. brasiliensis* (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html). Foram rastreadas 13 seqüências codificantes para proteínas provavelmente envolvidas na via metabólica de captação e distribuição de cobre em *P. brasiliensis*. As seqüências identificadas eram codificantes para as seguintes proteínas: Superóxido dismutase (SOD), cobre amino oxidase (CAO), tirosinase, lacases I, III e IV, metalochaperona de cobre ATX1, transportador de cobre CCC2 (localizado no aparato de Golgi), proteína de resposta ao cobre CRP e as enzimas mitocondriais citocromo c oxidases 15, 16 e 19. Além disso foi identificado também um fator de transcrição denominado *cuf1/mac1*. Todas as seqüências identificadas foram utilizadas para elaboração de um modelo (**Figura 10**) presumivelmente utilizado por *P. brasiliensis* na manutenção da homeostase de cobre.

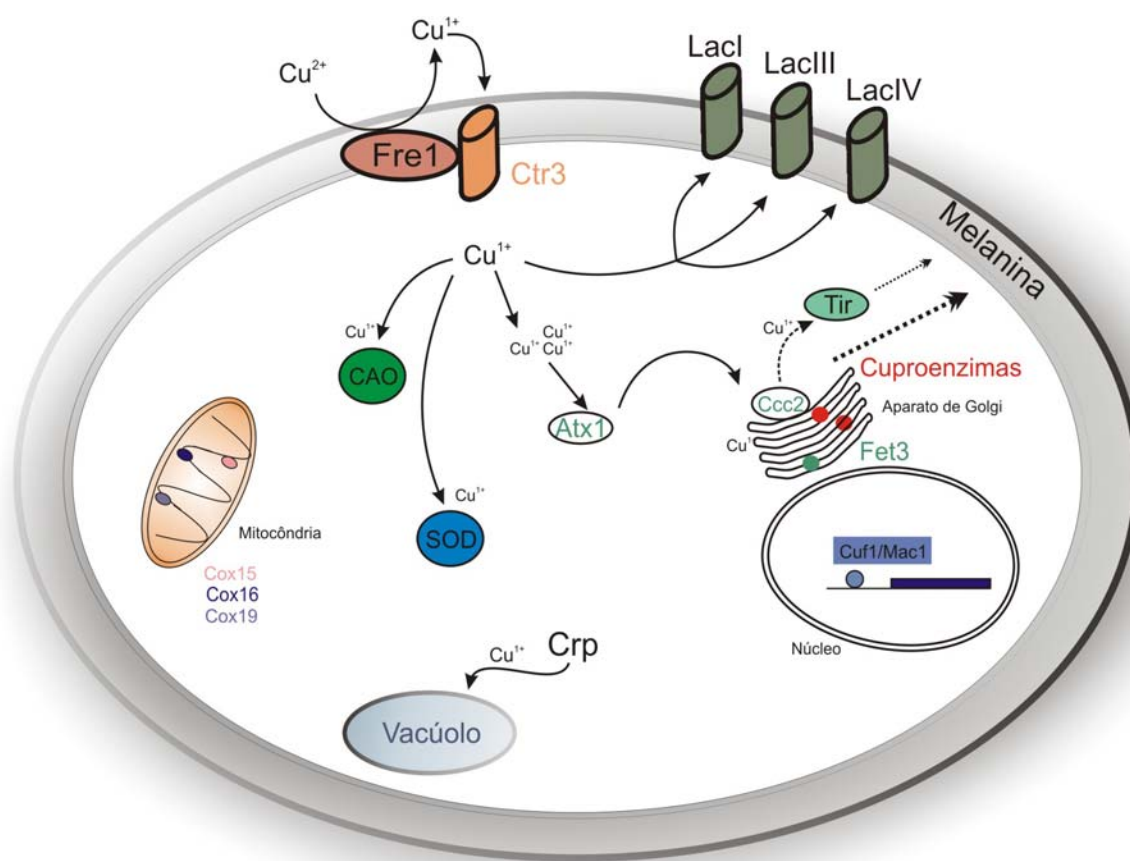


Figura 10: Modelo proposto para manutenção da homeostase de cobre no patógeno humano *P. brasiliensis*. O cobre extracelular é reduzido pelas metaloredutases Fre de Cu^{2+} para Cu^{+1} , sendo transportado posteriormente pela proteína Ctr3. No meio intracelular o cobre é captado pela molécula Atx1 e entregue para o transportador Ccc2, localizado na membrana de organelas secretoras, fornecendo cobre para cuproenzimas, incluindo a multicobre ferroxidase Fet3 que, juntamente com a permease Ftr1, medeiam à absorção de alta afinidade do ferro. Íons de cobre são incorporados pelas enzimas lacases (Lac) e tirosinases (Tir), que estão envolvidas na síntese de melanina. A proteína responsiva ao cobre (CRP) é um transportador vacuolar responsável por armazenar cobre em vacúolos, quando o mesmo encontra-se em excesso no meio intracelular. O fator de transcrição Cuf1/Mac1 regula a expressão de moléculas transportadoras de cobre CTRs durante a homeostase ou deficiência do metal. Íons livres no citosol são incorporados por enzimas cobre-dependentes, como por exemplo, a superóxido dismutase (SOD), a cobre amino oxidase (CAO) e a enzimas mitocondriais citocromo c oxidase (COX).

V.4 – Análises do perfil de expressão dos genes envolvidos no metabolismo de cobre em *P. brasiliensis* durante condições de restrição de cobre e/ou ferro.

Com o objetivo de avaliar a expressão dos genes codificantes para: o transportador de cobre de alta afinidade *PbCTR3*, do transportador de cobre *PbCCC2*, da metalochaperona de cobre *PbATX1*, do transportador vacuolar de cobre *PbCRP* e das enzimas cobre-dependentes: superóxido dismutase (*PbSOD*) e da cobre amino oxidase (*PbCAO*), durante deprivação de cobre e ferro, células leveduriformes do fungo *P. brasiliensis* foram cultivadas na presença de quelantes específicos de cobre e ferro (BCS e BPS, respectivamente). Ressalta-se que o crescimento do fungo na presença dos quelantes, foi similar ao crescimento do controle (dados não mostrados). Os RNAs obtidos nas condições de depleção de cobre, depleção de ferro e depleção de cobre e ferro foram utilizados para síntese de cDNAs e os níveis de expressão gênica avaliados por qRT-PCR em tempo real em triplicatas biológicas. Os resultados mostram que a expressão de *Pbctr3* (**Figura 11**, painel A) foi induzida durante a privação de cobre e ferro, quando comparado ao controle. Os transcritos *Pbcrp* (painel B), *Pbccc2* (painel C), *Pbatx1* (painel D), *Pbsod* (painel E) e *Pbcao* (painel F), apresentaram uma diminuição no nível de expressão durante privação de cobre e ferro.

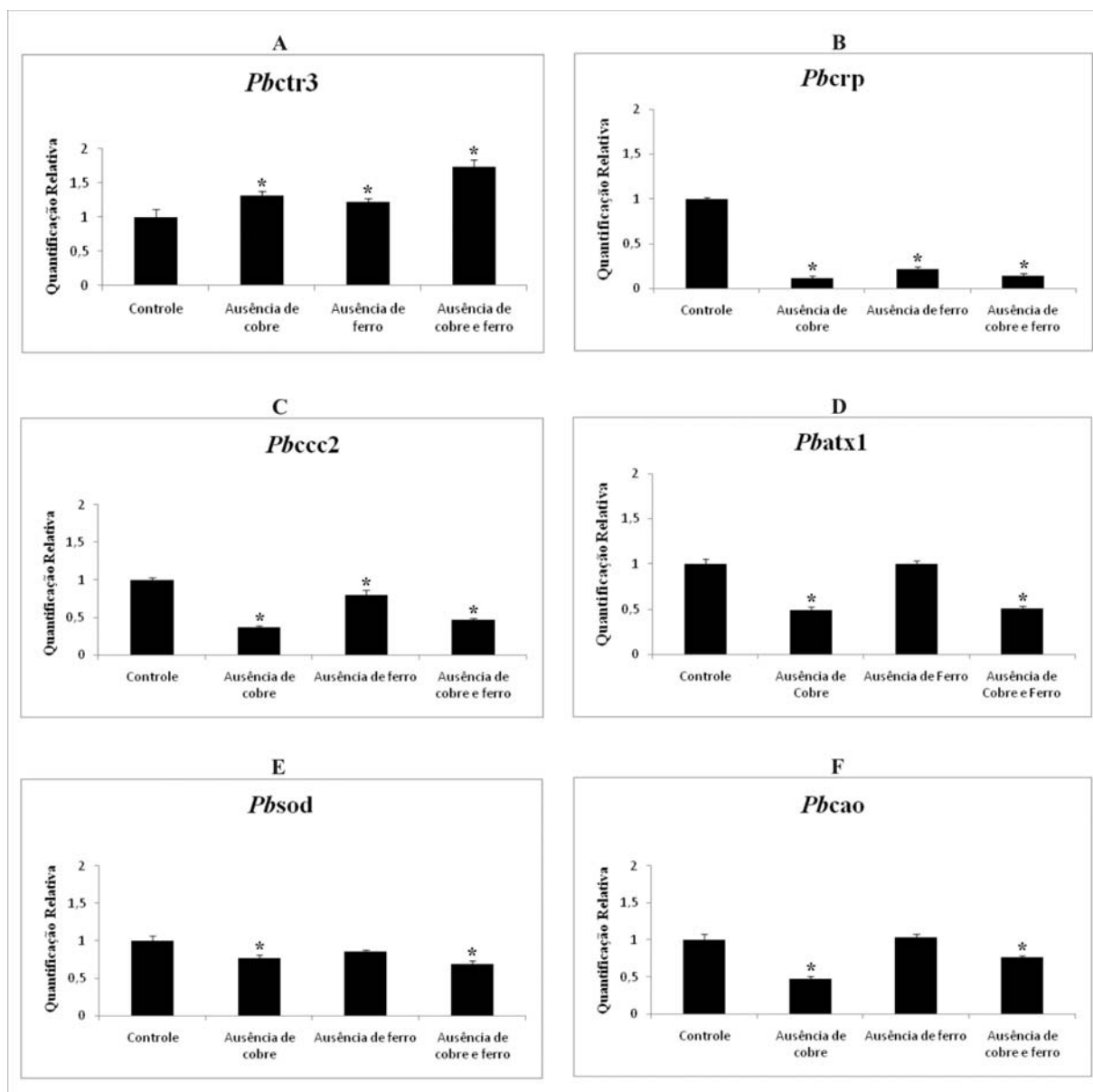


Figura 11: Análise da expressão de genes envolvidos na manutenção da homeostase de cobre em *P. brasiliensis*. A expressão dos genes de *P. brasiliensis* foi avaliada através de qRT-PCR em tempo real em diferentes condições experimentais (controle, ausência de cobre, ausência de ferro e ausência de cobre e ferro). 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 – Análises do perfil de expressão dos genes envolvidos no metabolismo de cobre em células leveduriformes de *P. brasiliensis* derivadas de órgãos de animais infectados.

Com a finalidade de avaliar os níveis de expressão dos genes *Pbctr3* e *Pbcrp* durante o processo infeccioso, experimentos de infecção foram realizados, onde RNAs extraídos de células leveduriformes de *P. brasiliensis* recuperadas de pulmão e baço foram obtidos e utilizados para a síntese de cDNA. Os níveis de expressão dos genes *Pbctr3* e *Pbcrp* foram avaliados por qRT-PCR em tempo real em células leveduriformes de *P. brasiliensis* derivadas de pulmão e baço de camundongos infectados em diferentes tempos de infecção (7 e 15 dias) (Figura 12). Os genes *Pbctr3* (painel A) e *Pbcrp* (painel B), apresentaram uma expressão induzida em 7 dias pós-infecção em pulmão e 15 dias pós-infecção em baço.

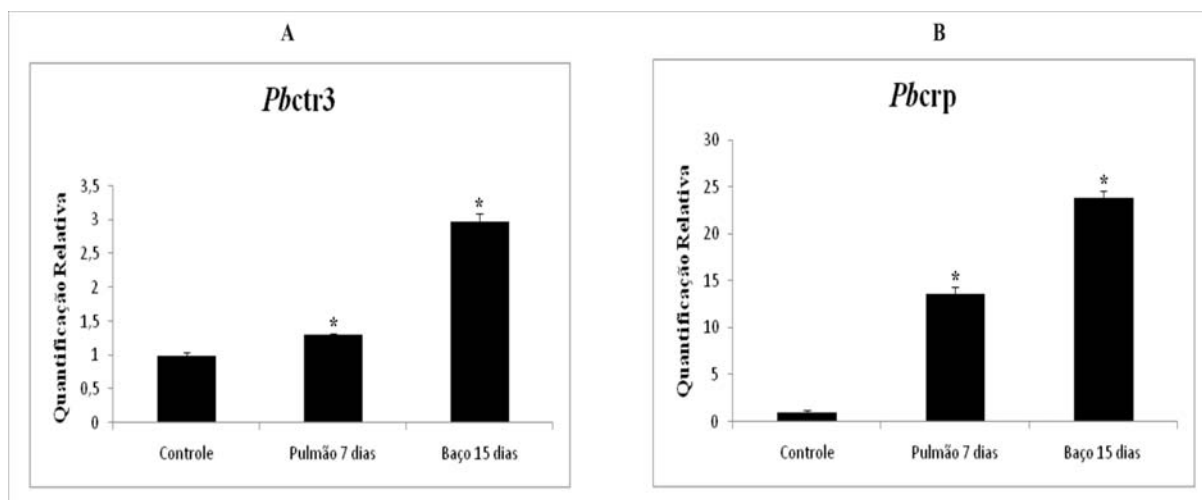


Figura 12: Análise da expressão dos genes *Pbctr3* e *Pbcrp* durante o processo infeccioso. A expressão dos genes foi avaliada através de qRT-PCR em células leveduriformes derivadas de infecção em pulmão e baço. Os valores da expressão dos genes foram normalizados utilizando-se os valores de expressão 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 $p \leq 0,05$ (*).

DISCUSSÃO

VI – Discussão

Com o propósito de identificar genes 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 hematogênica de disseminação fúngica. Nos modelos de infecção experimental foi observada alta frequência do transcrito *Pbctr3*, codificando um transportador de cobre de alta afinidade. O transcrito *Pbctr3* também foi identificado como um dos cDNAs mais abundantes na condição de infecção no hospedeiro, na análise do transcriptoma de *P. brasiliensis* derivado de fígado de camundongos B10A, o que reforça seu possível papel no processo infectivo (Costa *et al.*, 2007).

A identificação de genes induzidos em *P. brasiliensis* durante a infecção em fígado de camundongos (Bailão *et al.* 2006; Costa *et al.*, 2007), permitiu a sugestão de processos biológicos envolvidos na sobrevivência do *P. brasiliensis* durante o processo infeccioso. Sugere-se que para ocorrer uma colonização bem sucedida do hospedeiro, os microrganismos devem inicialmente obter nutrientes essenciais para o seu crescimento. O cobre é um desses nutrientes importantes para o estabelecimento da infecção, visto que o mesmo é requerido como cofator para uma diversidade de enzimas em processos biológicos essenciais para a manutenção celular. O fato de que a concentração disponível de micronutrientes como cobre para os microrganismos patogênicos é mantida abaixo da quantidade requerida para o desenvolvimento desses organismos, determina que a habilidade em se obter esses micronutrientes do hospedeiro defina, em grande parte, a virulência do patógeno (Rees &

Thiele, 2004). Em diversos microrganismos patogênicos a presença de cobre promove uma melhor interação do parasita com o hospedeiro e a progressão da doença, ocorrendo assim uma colonização bem sucedida, como descrito, por exemplo, em *C. albicans* (Eck *et al.*, 1999; Weissman *et al.*, 2000). Devido a identificação de transcritos de *Pbctr3* como altamente expresos durante o processo infectivo iniciou-se a investigação da homeostase de cobre em *P.brasiliensis*.

O cDNA apresentou um total de 1389 pares de bases, apresentando 421 e 389 nucleotídeos não traduzidos nas regiões 5' e 3', respectivamente. A seqüência apresenta um único quadro aberto de leitura (ORF) com 582pb, codificando uma proteína predita de 193 aminoácidos com massa molecular de 21,5 kDa e ponto isoelétrico de 8,6. Análises da seqüência de cDNA e de aminoácidos utilizando o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990), demonstraram alta identidade e similaridade entre seqüências de aminoácidos de CTR3 de fungos. Ressalta-se que o transportador de cobre de alta afinidade é descrito e caracterizado, demonstrando importante papel no crescimento e manutenção de atividades metabólicas essenciais para a sobrevivência e colonização dos hospedeiros por patógenos, assim como descrito para *C. neoformans* (Waterman *et al.*, 2007).

A seqüência genômica foi obtida e caracterizada. O gene homólogo do *P.brasiliensis* contém quatro exons interrompidos por três íntrons. Todas as seqüências intervenientes são flanqueadas por 5' *GT* e 3' *AG*. A seqüência apresenta domínios "Mets" ricos em metionina na região amino-terminal e histidinas e cisteínas distribuídas ao longo da região carboxi-terminal, o que caracteriza os transportadores de cobre da família CTR. A proteína deduzida *PbCTR3* apresentou também um possível sítio de *N*-glicosilação. Além disso, com base na seqüência completa de nucleotídeos de *Pbctr3* depositada no banco do genoma estrutural de

P. brasiliensis (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html), pode-se identificar a região promotora TATA Box, utilizando-se o algoritmo Promotor Scan (<http://www.bimas.cit.nih.gov/cgi-bin/molbio/proscan>).

Foram identificados ortólogos de genes envolvidos na manutenção da homeostase de cobre em *P. brasiliensis*, em 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 o transportador de cobre de alta afinidade (*Pbctr3*), superóxido dismutase (*Pbsod*), cobre amino oxidase (*Pbcao*), metalochaperona de cobre (*Pbatx1*), transportador de cobre (*Pbcc2*) localizado no aparato de Golgi, proteína responsiva ao cobre (*Pbcrp*), tirosinase (*Pbtir*), lacases I, III e IV (*PblacI*, *PblacIII* e *PblacIV*), e as enzimas mitocondriais citocromo c oxidases 15, 16 e 19 (*Pbcox15*, *Pbcox16* e *Pbcox19*). Além disso, as análises *in silico* revelaram um fator de transcrição denominado *cuf1/mac1*, descrito como regulador da expressão do transportador de cobre CTR4 em *Schizosaccharomyces pombe*. Durante a ausência de cobre, *cuf1*, ativa a transcrição do gene codificante para CTR4, aumentando assim a captação do metal, com o objetivo de manter a homeostase no meio intracelular. Quando o inverso acontece e o nível de cobre encontra-se em excesso, *cuf1* fica retido no citoplasma e não atua como fator de transcrição de CTR4, diminuindo sua expressão e controlando a quantidade do íon metálico no meio intracelular, mantendo assim a homeostase (Beaudoin *et al.*, 2006).

Os genes rastreados no banco do genoma estrutural de *P. brasiliensis*, com funções envolvidas na manutenção da homeostase de cobre são codificantes para enzimas que atuam em processos biológicos envolvidos diretamente com a virulência de patógenos. Foram identificados genes codificantes para tirosinase e lacases, que são enzimas que contêm cobre e

estão envolvidas na biossíntese de melanina, (Arredondo & Nunez, 2005). A melanina está implicada na patogênese de várias doenças humanas, incluindo algumas infecções microbianas. Transcritos codificantes para tirosinase foram superexpressos em células recuperadas de fígado de camundongos B10A infectados por *P. brasiliensis* (Bailao et al., 2006). Silva e colaboradores (2006) demonstraram que a melanização de *P. brasiliensis* reduz a fagocitose do fungo por macrófagos alveolares e peritoniais.

Foram identificados no banco do genoma estrutural de *P. brasiliensis* genes codificantes para *Pbatx1* e *Pbcc2* que estão diretamente envolvidos na captura e distribuição do íon cobre no meio intracelular. A molécula ATX1 é responsável por captar o cobre transportado por CTR3 através da membrana plasmática, levando-o à proteína CCC2 localizada no aparato de Golgi, sendo responsável pela entrega do metal às enzimas cobre-dependentes. Os genes *ccc2* e *atx1*, codificantes para homólogos de transportador de cobre e chaperona de cobre, respectivamente, coordenam e mantêm a homeostase de cobre e estão relacionados com a melanização de *C. neoformans* (Walton et al., 2005).

Outra classe de proteínas identificadas e possivelmente envolvidas no metabolismo de cobre em *P. brasiliensis*, são as metaloenzimas mitocondriais citocromo c oxidases (*Pbcox15*, *Pbcox16* e *Pbcox19*), que são enzimas que necessitam do íon cobre para desempenhar com eficiência sua função no processo de respiração celular, catalisando a reação final da cadeia de transporte de elétrons, passo essencial na respiração celular. Em mamíferos e leveduras, a enzima tem uma estrutura bastante complexa, contendo 13 subunidades, dois grupos heme e diversos outros cofatores metálicos (três íons de cobre, um de magnésio e um de zinco). Para a enzima captar os três íons de cobre necessários para desempenhar sua atividade ótima, o cobre contido no meio intracelular deve ser incorporado pela proteína COX17, rica em

cisteína, importante no transporte de cobre citosólico para o interior da mitocôndria. Após incorporar os átomos de cobre a proteína COX17 transfere-o para a proteína SCO1 que o transfere para outras proteínas, COX2 ou COX11, fazendo com que o mesmo seja disponibilizado para a citocromo c oxidase. Especula-se que a mitocôndria também funcione como organela armazenadora de cobre, assim como os vacúolos, sendo portanto envolvida na manutenção da homeostase do metal (Abajian *et al.*, 2004; Arnesano *et al.*, 2005; Andreini *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008).

Genes codificantes para superóxido dismutase (*PbSOD*), cobre amino oxidase (*PbCAO*) e para uma proteína responsiva ao cobre em *P. brasiliensis* (*PbCRP*) foram identificados. A enzima superóxido dismutase é descrita como necessária para a virulência em microrganismos patogênicos, pois os protege contra os danos da oxidação, causados pelo sistema imunitário do hospedeiro. Em *C. albicans* foi descrito que a SOD1 protege a célula contra radicais superóxido produzidos por macrófagos (Hwang *et al.*, 2002). Cobre amino oxidase, ainda não possui sua função claramente elucidada. Estudos sugerem que a molécula participe do processo de adesão celular (Yu *et al.*, 2003). No fungo patogênico *H. capsulatum*, foram identificados transcritos positivamente regulados em resposta à adição de sulfato de cobre (CuSO_4) a meios de cultura, utilizando a técnica de microarranjos de DNA. Nesse estudo o gene *crp1* que codifica uma proteína responsiva ao cobre, foi diferencialmente expresso. Sugere-se que a proteína CRP1 seja importante na manutenção da homeostase de cobre de *H. capsulatum*, visto que a mesma é requerida para o transporte e armazenamento de cobre em compartimentos intracelulares, estabelecendo a homeostase desse metal em condições de alta concentração do mesmo (Gebhart *et al.*, 2006).

A captação de ferro com alta afinidade requer um sistema eficiente de captação de cobre, visto que o primeiro sistema é acompanhado por um membro da família de cobre oxidases (enzimas cobre-dependentes), responsável pela oxidação de ferro à forma férrica (Stearman *et al.*, 1996). Em *S. cerevisiae* mutantes no gene que codifica para o transportador de alta afinidade de cobre são deficientes nos mecanismos de captação de ferro e cobre (Dancis *et al.*, 1994). Interessantemente, a alta redundância de transcritos relacionados com a captação de ambos os metais foram sinergicamente induzidos durante a infecção de *P. brasiliensis* (Bailão *et al.* 2006). Devido à interdependência da captação de cobre e ferro, os níveis dos transcritos *Pbctr3*, *Pbccc2*, *Pbatx1*, *Pbcrp*, *Pbsod* e *Pbcao* foram avaliados durante privação de cobre e ferro.

Pbctr3 foi induzido durante a privação de cobre e/ou ferro, quando comparado ao controle. Os transcritos *Pbcrp* e *Pbccc2* apresentaram um decréscimo na expressão durante a depleção de cobre, ferro, bem como, durante a depleção combinada dos dois metais. O transcrito *Pbatx1*, apresentou decréscimo tanto durante a ausência de cobre quanto durante a depleção de cobre e ferro. Os resultados das análises de expressão *in vitro* dos genes *Pbctr3* e *Pbcrp* revelaram que estes dois genes são regulados de forma antagonista em relação à disponibilidade de íons cobre. Estudos de análises de expressão de outros organismos corroboram o observado (Gebhart *et al.*, 2006; Marvin *et al.*, 2003).

Os resultados de qPCR em tempo real demonstram a participação dos genes *Pbatx1* e *Pbccc2* na manutenção da homeostase de cobre. As relações entre a homeostase de ferro e cobre são bem estabelecidas em fungos. Por exemplo, em *C. neoformans* cobre é requerido para a atividade da enzima lacase e mutações nos ortólogos codificantes da cobre-chaperona Atx1 e do transportador de cobre Ccc2 reduzem a produção de melanina e dificultam o

crescimento do fungo em condições de baixo teor de ferro. Assim como descrito em *S. cerevisiae*, essas proteínas poderiam funcionar entregando íons cobre para ferro oxidases (Walton *et al.*, 2005). Em *S. cerevisiae* CCC2 é uma ATPase envolvida no transporte de íons cobre para a luz de vesículas pós-Golgi (Yuan *et al.*, 1997). Originalmente essa ATPase pode funcionar no transporte do excesso de cobre do citoplasma, fato que é observado em bactérias (Phung *et al.*, 1994). Em células eucarióticas a principal função desse transportador é aparentemente fornecer cobre para vesículas da rede pós-Golgi, onde ocorre a montagem do complexo que contém oxidoredutases cobre-dependentes e uma permease de ferro (Phung *et al.*, 1994). Conseqüentemente mutações em *ccc2* resultam na deficiência de ferro (Nelson, 1999; Weissman *et al.*, 2002).

Os níveis de expressão dos transcritos *Pbsod* e *Pbcao* apresentaram decréscimo durante a depleção de cobre, contudo não houve alteração na expressão desses transcritos durante depleção de ferro. Em ensaios de depleção simultânea de ambos os metais, observou-se repressão dos níveis dos transcritos *Pbsod* e *Pbcao*, provavelmente ocasionada pela ausência de íons cobre. A enzima SOD descrita como fator de virulência e a proteína CAO são classificadas como enzimas cobre-dependentes. O decréscimo na expressão desses genes na ausência de cobre sugere que a produção destas proteínas seja dependente de cobre. Conseqüentemente a manutenção da homeostase de cobre é essencial para a produção de fatores de virulência cobre-dependentes como por exemplo superóxido dismutase, tirosinases e lacases. (Hwang *et al.*, 2002; Bailao *et al.*, 2006).

A expressão dos genes *Pbctr3* e *Pbcrp* foi analisada durante o processo infectivo em nichos do hospedeiro. O gene *Pbctr3* é induzido durante o processo infeccioso, provavelmente devido à baixa concentração de cobre nos tecidos do hospedeiro. A diminuição

da disponibilidade de micronutrientes livres nos tecidos do hospedeiro é uma estratégia de defesa deste contra o patógeno (Marvin *et al.*, 2003). Dessa maneira pode-se sugerir que *PbCTR3* participa na captura de íons cobre durante a infecção, desempenhando, assim, papel essencial na estratégia de sobrevivência do patógeno nos tecidos do hospedeiro. Ressalte-se que dados recentes de nosso grupo revelam que o transcrito *Pbctr3* é superexpresso em *P. brasiliensis* durante a infecção de macrófagos murinos (Dantas *et al.*, 2009, em revisão).

Os transcritos codificantes para *PbCRP*, foram aumentados durante a infecção de camundongos. O antagonismo na expressão do gene *Pbcrp* nas condições *in vitro* e durante infecção pode ser explicado pelo fato de que *in vitro* o cobre do meio de cultura está imobilizado no quelante. Dessa maneira, independente do aumento da expressão do *Pbctr3*, os níveis de cobre intracelulares permanecerão baixos resultando na baixa expressão de *Pbcrp*. De forma complementar, embora os níveis de cobre livre nos tecidos do hospedeiro estejam baixos, o fungo ainda consegue mobilizar o íon cobre para captura, fato qual resulta no aumento de expressão de *Pbcrp*.

A diferença de expressão dos genes *Pbctr3* e *Pbcrp* nos diferentes órgãos, pulmão e baço sugere que *P. brasiliensis* apresenta uma resposta nicho específica frente as diferentes condições de disponibilidade do íon cobre em distintos tecidos. Padrões de expressão nicho específicos tem sido observados em outros fungos dimórficos (Barelle *et al.*, 2006) e em *P. brasiliensis* (Dantas *et al.*, 2009, em revisão).

Muitos são os papéis desempenhados pelo íon cobre na biologia e mecanismos envolvidos no processo de virulência em microrganismos patogênicos. O conhecimento da regulação da homeostase de cobre permanece escasso e, portanto, apresenta-se como um

assunto nascente. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram que o fungo *P. brasiliensis* possui uma rede de genes regulados por privação de cobre e ferro, especialmente os genes já descritos na literatura como relacionados com virulência e patogenicidade. Nessa classe de genes incluem-se o transportador de cobre de alta afinidade, assim como todos os outros genes que participam na manutenção da homeostase de cobre no meio intracelular. *P. brasiliensis* apresentou expressão diferencial dos genes envolvidos na homeostase de cobre durante privação dos micronutrientes cobre e ferro, assim como durante infecção experimental em pulmão e baço, sugerindo que os micros ambientes do hospedeiro, provavelmente apresentam carência de micronutrientes essenciais para a sobrevivência do patógeno. Com a finalização do trabalho, surgem novas perspectivas e abordagens, onde estudos funcionais dos genes envolvidos no metabolismo de cobre devem ser realizados.

CONCLUSÕES

VII – Conclusões

A partir dos resultados obtidos foi possível verificar que:

- O gene codificante para o transportador de cobre de alta afinidade (*PbCTR3*) de *P. brasiliensis* apresenta 1.655pb, contendo quatro exons interrompidos por três íntrons.
- O gene codificante para o transportador de cobre de alta afinidade (*PbCTR3*) de *P. brasiliensis* codifica uma proteína predita com 193 resíduos de aminoácidos, massa molecular predita de 21,5 kDa e ponto isoelétrico predito de 8,6.
- A seqüência genômica de *PbCTR3*, apresenta os domínios “Mets” ricos em metionina na região amino-terminal e histidinas e cisteínas distribuídas ao longo da região carboxi-terminal, o que caracteriza os transportadores da família CTRs. A proteína deduzida apresenta um possível sítio de *N*-glicosilação. A região promotora TATA box foi identificada na seqüência genômica.
- A proteína *PbCTR3* apresentou alta similaridade e identidade com proteínas CTR3 de outros fungos.
- *P. brasiliensis* apresenta no seu genoma genes codificantes para proteínas descritas como envolvidas na manutenção da homeostase de cobre em outros organismos.
- Genes possivelmente envolvidos na manutenção da homeostase de cobre em *P. brasiliensis* foram diferencialmente expressos em privação de cobre e/ou ferro, mimetizando as condições *in vivo* no hospedeiro e foram induzidos durante o processo infeccioso em nichos (pulmão e baço) do hospedeiro (7 e 15 dias). A partir dos dados

pode-se sugerir que esses genes exerçam um importante papel durante a manutenção da homeostase de cobre em *P. brasiliensis*, bem como, durante o processo infectivo.

PERSPECTIVAS

VIII – Perspectivas

A partir dos resultados obtidos, as perspectivas deste trabalho são:

- Citolocalização da proteína *PbCTR3* em células de *P. brasiliensis* por microscopia eletrônica de transmissão (em desenvolvimento).
- Construir bibliotecas subtraídas de cDNA a partir de RNAs obtidos a partir de leveduras crescidas na presença e ausência de cobre (em desenvolvimento).
- Análise proteômica diferencial de extrato protéico de células leveduriformes crescidas na presença e ausência de cobre.
- Identificação da proteína *PbCTR3* no proteoma de *P. brasiliensis* por espectrometria de massas.

BIBLIOGRAFIA

IX – Referências Bibliográficas

Abajian, C., Yatsunyk, L.A., Ramirez, B.E. & Rosenzweig, A.C. (2004). Yeast *cox17* solution structure and copper(I) binding. *J. Biol. Chem.* 279, 53584–53592.

Ajello, L. & Polonelli, L. (1985). Imported paracoccidioidomycosis: a public health problem in non-endemic areas. *Eur J Epidemiol* 1(3): 160-5.

Almeida, A. J., Carmona, J. A., Cunha, C., Carvalho, A., Rappleye, C. A., Goldman, W. E., Hooykaas, P. J., Leao, C., Ludovico, P. and Rodrigues, F. (2007). Towards a molecular genetic system for the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* 44(12): 1387-98.

Almeida, A. J., Matute, D. R., Carmona, J. A., Martins, M., Torres, I., McEwen, J. G., Restrepo, A., Leao, C., Ludovico, P. and 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.

Alsbaugh JA, Perfect JR, Heitman J. (1997). *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein alpha subunit GPA1 and cAMP. *Genes Dev* 11: 3206–3217.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-402.

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

Andreini, C., Banci, L., Bertini, I. & Rosato, A. (2008). Occurrence of copper proteins through the three domains of life: a bioinformatic approach. *J. Proteome Res.* 7, 209–216.

Aristizabal, BH, Clemons, KV, Cock, AM, Restrepo, A and Stevens, DA (2002). Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. *Med Mycol* 40(2): 169-78.

Arnesano, F., Balatri, E., Banci, L., Bertini, I. & Winge, D.R. (2005). Folding studies of Cox17 reveal an important interplay of cysteine oxidation and copper binding. *Structure* 13, 713–722.

Arredondo, M. & Nunez, M. T. (2005). Iron and copper metabolism. *Mol Aspects Med* 26(4-5): 313-27.

Askwith CC, de Silva & Kaplan J (1996). Molecular biology of iron acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 20: 27-34.

Bagagli, E., Bosco, S. M., Theodoro, R. C. and Franco, M. (2006). Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Genet Evol* 6(5): 344-51.

Bailao A. M, Schrank A, Borges C. L, Dutra V, W. I. Molinari-Madlum E. E, Soares Felipe M. S.S, Mendes-Giannini M. J, Martins W. S, Pereira M, 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.* Oct; 8(12-13):2686-97.

Barelle, C. J., Priest, C. L., Maccallum, D. M., Gow, N. A., Odds, F. C. and Brown, A. J. (2006). Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. *Cell Microbiol* 8(6): 961-71.

Bastos, K. P., Bailao, A. M., Borges, C. L., Faria, F. P., Felipe, M. S., Silva, M. G., Martins, W. S., Fiuza, R. B., Pereira, M. and Soares, C. M. (2007). The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol* 7: 29.

Beaudoin, J., Labbé, S. (2006). Copper induces Cytoplasmic Retention of Fission Yeast Transcription Factor Cuf1. *Eukaryot cell.* 5 (2):277-292.

Beaudoin, J., Labbé, S. (2007). Crm1-mediated nuclear export of the *Schizosaccharomyces pombe* transcription factor Cuf1 during a shift from low to high copper concentrations. *Eukaryot cell.* 6(5): 764-75.

Bellemare, D.R. *et al.* (2002). Ctr6, a vacuolar membrane copper transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 277, 46676–46686.

Bialek, R., Ibricevic, A., Aepinus, C., Najvar, L. K., Fothergill, A. W., Knobloch, J. and Graybill, J. R. (2000). Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. *J Clin Microbiol* 38(8): 2940-2.

Bookout, A. L., C. L. Cummins, D. J. Mangelsdorf, J. M. Pesola, and M. F. Kramer. (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.

Borelli, D. (1972). Some ecological aspects of paracoccidioidomycosis. Paracoccidioidomycosis. Medellin, Pan Amer Hlth Org Scient Publ: 59-64.

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

Bruneau, J-M., Magnin, T., Tagat, E., Legrand, R., Bernard, M., Diaquin, M., Fudali, C., Latgé, J-P. (2001). Proteome analysis of *Aspergillus fumigates* identifies glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. Electrophoresis, 22, 2812–2823.

Camargo, Z. P. & Franco, M. F. (2000). Current Knowledge on Pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. Rev Iberoam Micol 17: 41-48.

Carrero, L. L., Nino-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. and San-Blas, G. (2008). New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. Fungal Genet Biol 45(5): 605-12.

Causier, B. & Davies, B. (2002). Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. Plant Molecular Biology 50: 855-870.

Clemons, K. V., Feldman, D. and Stevens, D. A. (1989). Influence of oestradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Gen Microbiol* 135(6): 1607-17.

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.

Corredor, G. G., Peralta, L. A., Castano, J. H., Zuluaga, J. S., Henao, B., Arango, M., Tabares, A. M., Matute, D. R., McEwen, J. G. and Restrepo, A. (2005). The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Med Mycol* 43(3): 275-80.

Costa, M., Borges, C. L., Bailao, A. M., Meirelles, G. V., Mendonca, Y. A., Dantas, S. F., de Faria, F. P., Felipe, M. S., Molinari-Madlum, E. E., Mendes-Giannini, M. J., Fiuza, R. B., Martins, W. S., Pereira, M. and Soares, C. M. (2007). Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. *Microbiology* 153(Pt 12): 4194-207.

Coutinho, Z. F., Silva, D., Lazera, M., Petri, V., Oliveira, R. M., Sabroza, P. C. and Wanke, B. (2002). Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica* 18(5): 1441-54.

Dancis, A., Yuan, D. S., Haile, D., Askwith, C., Eide, D., Moehle, C., Kaplan, J. and Klausner, R. D. (1994). Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell* 76(2): 393-402.

Dantas, S.F.I.M., Rezende, T.C.V., Bailão, A.M., Taborda, C.P., Santos, R.S., Castro, K.P., Soares, C. M. A. (2009). Identification and characterization of antigenic proteins potentially expressed during the infectious process of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes and infection* (em revisão).

Eck, R., Hundt, S., Hartl, A., Roemer, E & Kunkel, W. (1999). A multicopper oxidase gene from *Candida albicans*: cloning, characterization and disruption. *Microbiology*. 145, 2415-2422.

Eide, D. J. (2003). Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Nutr.* 133:1532S–1535S.

Ewing, B., Granden, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred II. Error probabilities. *Genome Res.* 8:186-194.

Ewing, B., Hillier, L., Wendk, M. C., Granden, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8:175-185.

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. and Camargo, Z. P. (2003). Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* 39(1): 60-9.

Felipe, M. S., Andrade, R. V., Arraes, F. B., Nicola, A. M., Maranhao, A. Q., Torres, F. A., Silva-Pereira, I., Pocas-Fonseca, M. J., Campos, E. G., Moraes, L. M., Andrade, P. A., Tavares, A. H., Silva, S. S., Kyaw, C. M., Souza, D. P., Pereira, M., Jesuino, R. S., Andrade, E. V., Parente, J. A., Oliveira, G. S., Barbosa, M. S., Martins, N. F., Fachin, A. L., Cardoso, R. S., Passos, G. A., Almeida, N. F., Walter, M. E., Soares, C. M., Carvalho, M. J. and Brigido, M. M. (2005). Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem* 280(26): 24706-14.

Fields, S., Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340: 245-246.

Fields, S., Sternglanz, R. (1994). The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends genet.*, 10: 286-292.

Fonseca, C. A., Jesuino, R. S., Felipe, M. S., Cunha, D. A., Brito, W. A. and Soares, C. M. (2001). Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 3(7): 535-42.

Franco M, Bagagli E, Scapolio S, Lacaz C S (2000). A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med. Mycol.* 2000. 38: 185-91.

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

Gebhart, D., Bahrami, A. K., & Sil, A. (2006). Identification of a Copper-Inducible Promoter for Use in Ectopic Expression in the Fungal Pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Eukaryotic Cell*, p. 935–944, Vol. 5, No. 6.

Georgatsou, E., Marvrogianis, L.A., Frangiadakis, G. S., Alexandraki, D. (1997). The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J. Biol. Chem.* 272:13786–13792.

Giles, S. S., Stajich, J. E., Nichols, C., Gerrald, Q. D., Alspaugh, J. A., Dietrich, F. and Perfect, J. R. (2006). The *Cryptococcus neoformans* catalase gene family and its role in antioxidant defense. *Eukaryot Cell* 5(9): 1447-59.

Hamer, D. H., (1986). Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* 55:913–951.

Hamer, D. H., Thiele, D. J., Lemontt, J. E., (1985). Function and autoregulation of yeast copper thionein. *Science*, 228:685–690.

Hofmann, K., Bucher, P., Falquet, L., Bairoch, A. (1999). The Prosite Database, It's Status In 1999. *Nucleic Acids Res.* 27:215-219.

Hwang, C.S. *et al.* (2002). Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology* 148, 3705–3713.

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

Jung, W. H., Sham, A., White, R. and Kronstad, J. W. (2006). Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Biol* 4(12): e 410.

Kim, B. E., T. Nevitt, & D. J. Thiele. (2008). Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat. Chem. Biol.* 4:176–185.

Lacaz, C. S., E., P. and Martins, J. E. C. (1991). *Paracoccidioidomycosis*. *Micologia Médica*. São Paulo, Sarvier Editora: 248-261.

Laliberte', J., & S. Labbe'. (2005). Mechanisms of copper loading on the *Schizosaccharomyces pombe* copper amine oxidase 1 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 152:2819–2830.

Leclerc, M. C., Philippe, H. and Gueho, E. (1994). Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J Med Vet Mycol* 32(5): 331-41.

Loose, D. S., Stover, E. P., Restrepo, A., Stevens, D. A. and Feldman, D. (1983). Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(24): 7659-63.

López-Villar E, Monteoliva L, Larsen MR, Sachon E, Shabaz M, Pardo M, Pla J, Gil C, Roepstorff P, Nombela C (2006). Genetic and proteomic evidences support the localization of yeast enolase in the cell surface. *Proteomics* 6: 107-18.

Lutz, A . (1908). Uma micose pseudo-coccídica localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento das hipo-blastomicoses americanas. *Bras. Med.* 22:121-124.

Martinez, R. (1997). Blastomicose-Sul-Americana (Paracoccidioidomycose)- Etioepidemiologia e Ecologia. *Tratado de Infectologia*. R. Veronesi and R. Focaccia, Ateneu: 1082.

Marvin, M E., Williams, P H., Cashmore, A M. (2003). The *Candida albicans* CTR1 gene encodes a functional copper transporter. *Microbiology*. 149:1461-1474.

Marvin, M. E.; Mason, R. P.; Cashmore A. M. (2004). The *CaCTR1* gene is required for high-affinity iron uptake and is transcriptionally controlled by a copper-sensing transactivator encoded by *CaMAC1*. *Microbiology*, 150, 2197–2208.

Matute, D. R., Sepulveda, V. E., Quesada, L. M., Goldman, G. H., Taylor, J. W., Restrepo, A. and McEwen, J. G. (2006). Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol* 44(6): 2153-7.

Murray, P. R., G. S. Kobayashi, M. A. Pfaller & K. S. Rosenthal. (2004). *Microbiologia Médica*. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ. 755 pgs.

Nelson, N. (1999). Metal ion transporters and homeostasis. *The EMBO Journal*. Vol 18, n. 16, pp. 4361-4371.

Onodera J., Ohsumi, Y., (2005). Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J Biol Chem* 280: 31582–31586.

Paniago, A. M., Aguiar, J. I., Aguiar, E. S., da Cunha, R. V., Pereira, G. R., Londero, A. T. and Wanke, B. (2003). Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 36(4): 455-9.

Panunto-Castelo, A., Freitas-da-Silva, G., Bragheto, I. C., Martinez, R. and Roque-Barreira, M. C. (2003). *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens: recognition by IgG from patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect* 5(13): 1205-11.

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

Peña, M.M., Puig, S. & Thiele, D.J. (2000). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J. Biol. Chem.* 275, 33244–33251.

Peter C., Laliberté J., Beaudoin J., and Labbé S. (2008). Copper Distributed by Atx1 Is Available to Copper Amine Oxidase 1 in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell*, October, p. 1781-1794, Vol. 7, No. 10.

Petris, M.J. (2004). The SLC31 (Ctr) copper transporter family. *Eur J Physiol* 447:752–755.

Phung, L. T., G. Ajlani, & R. Haselkorn. (1994). P-type ATPase from the cyanobacterium *Synechococcus* 7942 related to the human Menkes and Wilson disease gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9651–9654.

Puig, S., Lee, J., Lau, M. & Thiele, D.J. (2002). Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J. Biol. Chem.* 277, 26021–26030.

Puig, S., Thiele, D J. (2002). Molecular Mechanism of copper uptake and distribution. *Bioinorganic chemistry*. 6:171-180.

Queiroz-Telles, F. (1994). *Paracoccidioides brasiliensis* ultrastructural Wndings. *Paracoccidioidomycosis*. M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno and G. Del Negro. London, CRC Press: 27–44.

Rappleye, C. A. and Goldman, W. E. (2006). Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu Rev Microbiol* 60: 281-303.

Rees, E. M. & Thiele, D. J. (2004). From aging to virulence: forging connections through the study of copper homeostasis in eukaryotic microorganisms. *Curr Opin Microbiol* 7, 175–184.

Rees, E.M. & Thiele, D.J. (2007). Identification of a vacuole-associated metalloreductase and its role in Ctr2-mediated intracellular copper mobilization. *J. Biol. Chem.* 282, 21629–21638.

Restrepo A & Jiménez B. E (1980). Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined medium. *J. Clin. Microbiol.* 12, 279-281.

Restrepo, A. (1985). The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia* 23(5): 323-34.

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

Restrepo-Moreno, A. (2003). *Paracoccidioidomycosis*. *Clinical Mycology*. W. E. Dismukes, P. G. Pappas and J. Sobel. New York, Oxford University Press: 328–345.

Richie, D. L & Askew D.S. (2008). Autophagy a role in metal ion homeostasis?. *Landes Bioscience* 4:1, 115-117.

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. and Bagagli, E. (2007). Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol*: 1-6.

Rustici, G., Bakel, H. V., Lackner, D. H., Holstege, F. C., Wijmenga c., Bahler, J., Brazma, A. (2005). Global transcriptional responses of fission and budding yeast to changes in copper and iron levels: a comparative study. *Physiol. Genomics*. 11;22(3):356-67.

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

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Samuels, N. M., & J. P. Klinman. (2005). 2,4,5-Trihydroxyphenylalanine quinone biogenesis in the copper amine oxidase from *Hansenula polymorpha* with the alternate metal nickel. *Biochemistry* 44:14308–14317.

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

San-Blas, G. and Nino-Vega, G. (2001). *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. *Fungal pathogenesis: principles and clinical applications*. R. L. Cihlar and R. A. Calderone. New York, Marcel Dekker: 205-242.

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

San-Blas, G., San-Blas, F., Rodriguez, L. E. & Castro, C. J. (1987). A model of dimorphism in pathogenic fungi: *Paracoccidioides brasiliensis*. *Acta Cient Venez* 38(2): 202-11.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 74(12):5463-7.

Sano, A., Nishimura, K. & 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.

Scandalios, J. G. (2002). The rise of ROS, *Trends Biochem. Sci.* 27 - 483-486.

Schaechter, M., N. C. Engleberg, B. J. Eisenstein & G. Medoff. (2002). *Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas*. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ. 642 pgs.

Shikanai-Yasuda M.P, Telles Filho F.Q, Mendes R.P, Colombo A.L, Moretti M.L. (2006). Consenso em paracoccidioidomicose. *Rev Soc Bras Med Trop.* 39:297-30.

Silva, M. B., Marques, A. F., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., Travassos, L. R. & Taborda, C. P. (2006). Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect* 8(1): 197-205.

Stearman, R., Yuan, D. S., Yamaguchi-Iwai, Y., Klausner, R. D. & Dancis, A. (1996). A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* 271(5255): 1552-7.

Svidzinski, T. I., Miranda Neto, M. H., Santana, R. G., Fischman, O. & Colombo, A. L. (1999). *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 41(5): 279-83.

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

Theil, E. C., & R. S. Eisenstein. (2000). Combinatorial mRNA regulation: iron regulatory proteins and iso-iron-responsive elements (Iso-IREs). *J. Biol. Chem.* 275:40659–40662.

Theodoro, R. C., Candeias, J. M., Araujo, J. P., Jr., Bosco Sde, M., Macoris, S. A., Padula, L. O., Franco, M. & Bagagli, E. (2005). Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol* 43(8): 725-9.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G. (1997). The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids. Res.* (24):4876-4882.

Timm J, Post FA, Bekker LG, Walther GB, Wainwright HC, Manganeli R, Chan WT, Tsenova L, Gold B, Smith I, Kaplan G & McKinney JD (2003). Differential expression of iron-, carbon-, and oxygen-responsive mycobacterial genes in the lungs of chronically infected mice and tuberculosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:14321-6

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. and Tone, L. G. (2008). Fungal infection by *Paracoccidioides brasiliensis* mimicking bone tumor. *Pediatr Blood Cancer*.

Van Ho, A., McVeyWard, D. & Kaplan J. (2002). Transition metal transport in Yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 2002. 56:237–61.

Villa, L. A., Tobon, A., Restrepo, A., Calle, D., Rosero, D. S. & Gomez, B. L. (2000). Central nervous system paracoccidioidomycosis. Report of a case successfully treated with itraconazol. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 42(4): 231-4.

Villar, L. A., Salazar, M. E. & Restrepo, A. (1988). Morphological study of a variant of *Paracoccidioides brasiliensis* that exists in the yeast form at room temperature. *J Med Vet Mycol* 26(5): 269-76.

Walton, F. J., Idnurm, A. & Heitman, J. (2005). Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 57(5): 1381-96.

Waterman, S.R. *et al.* (2007). Role of a CUF1/CTR4 copper regulatory axis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Invest.* 117, 794–802.

Weissman, Z., Berdiceevsky, I., Cavari, B., z & Kornitzer, D. (2000). The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 3520-3525.

Weissman, Z., Shemer, R., and Kornitzer, D. (2002) Deletion of the copper transporter CaCCC2 reveals two distinct pathways for iron acquisition in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 44: 1551–1560.

Wong, P.C. *et al.* (2006). Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2886–2891

Wood L.K, Thiele D.J. (2008). Transcriptional activation in yeast in response to copper deficiency involves copper-zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem.* vol./is. 284/1(404-13), 0021-9258.

Woodacre, A., Mason, R. P. Jeeves, R. E., & Cashmore, A. M. (2008). Copper-dependent transcriptional regulation by *Candida albicans* Mac1p. *Microbiology* 154, 1502-1512.

Yu, P. H., S. Wright, E. H. Fan, Z. R. Lun, & D. Gubisne-Harberle. (2003). Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1647:193–199.

Yuan, D.S., Dancis, A., and Klausner, R.D. (1997). Restriction of copper export in *Saccharomyces cerevisiae* to a late Golgi or post-Golgi compartment in the secretory pathway. *J Biol Chem* 272: 25787–25793.

ANEXOS

X - Anexos

Anexo X. 1: Análise de interações inter-moleculares do transportador de cobre de alta afinidade (*Pbctr3*) de *Paracoccidioides brasiliensis* através da técnica de duplo-híbrido.

Na fase pós genômica em que hoje se encontram muitas pesquisas, se torna cada vez mais indispensável à compreensão dos muitos processos biológicos inerentes a qualquer organismo, alguns como: regulação da transcrição, respostas às condições ambientais, transdução de sinal, etc (Causier & Davies, 2002). A chave para a compreensão de muitos desses processos biológicos reside no estudo da interação física entre proteínas.

O papel desempenhado pelo transportador de cobre de alta afinidade (*PbCTR3*) de *P. brasiliensis* ainda não é elucidado. O sistema de duplo híbrido em levedura (*S. cerevisiae*) é uma metodologia que foi desenvolvida para identificar genes que codificam proteínas (presas) que interagem com uma proteína alvo (isca) *in vivo*, com a vantagem do estudo das interações dessas proteínas em sua conformação original (Fields & Song, 1989; Fields & Sternglanz, 1994). A base para o sistema está na estrutura de um fator de transcrição que tem dois domínios fisicamente separados: o domínio de ligação ao DNA (BD) e o domínio de ativação da transcrição (AD). Os genes codificantes para estes domínios estão presentes em plasmídeos diferentes onde são clonados genes de uma biblioteca de cDNA (presa) e o gene para o qual se deseja rastrear a interação (isca). Caso as proteínas façam interação *in vivo* o fator de transcrição atua sobre o promotor que se situa no início de um gene repórter, o qual determina o crescimento das leveduras em meio seletivo, onde crescem apenas as leveduras que apresentam proteínas que interagem. O princípio da estratégia que caracteriza a metodologia de duplo híbrido está descrito na **Figura 13**.

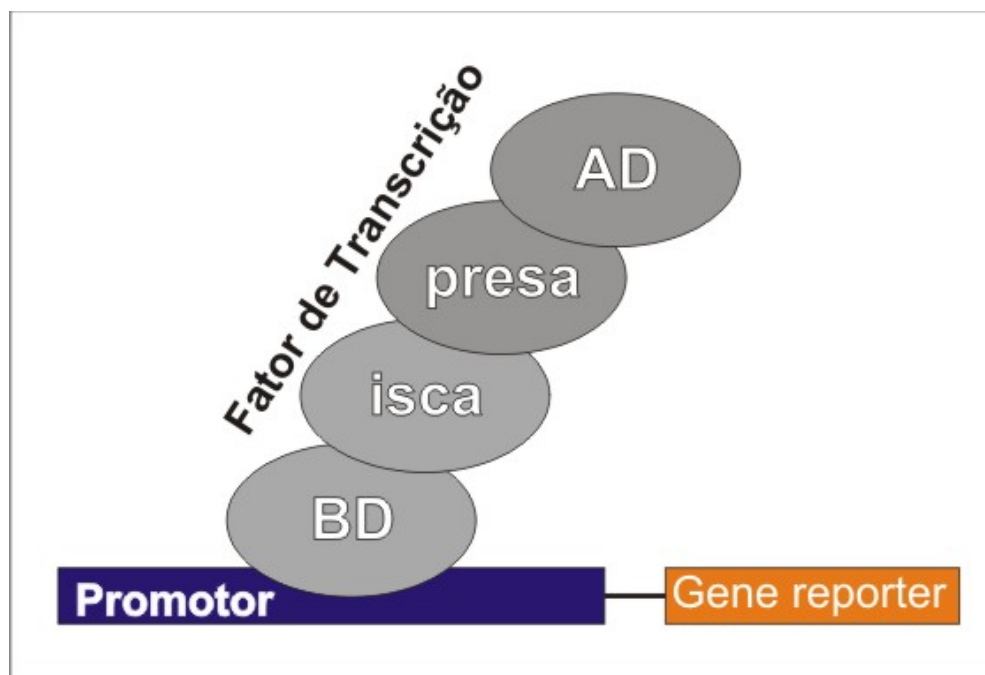


Figura 13: Esquema da técnica do duplo híbrido em leveduras. BD – Domínio de ligação à região promotora do DNA, o qual é fusionado ao *PbCTR3* (isca). AD – Domínio de ativação da transcrição, o qual é fusionado às proteínas (presas) de *P. brasiliensis*. A interação de proteínas fusionadas aos domínios (BD e AD) compõe o fator de transcrição que ativa a expressão do gene repórter permitindo o crescimento das leveduras em meio seletivo.

O estudo de prováveis interações do CTR3 de *P. brasiliensis* com outras moléculas foi realizado através da utilização da técnica de duplo-híbrido em *S. cerevisiae*, cepas AH109 e Y187 (Matchmaker™ Library Construction & Screening - Clontech Laboratories, Inc.). O cDNA codificante para CTR3 foi clonado no vetor de expressão pGBKT7, em fase de leitura com o domínio GAL4 de ligação ao DNA. O vetor possui gene *Trp1*, permitindo a seleção em meio mínimo sem triptofano, e o produto clonado foi transformado na cepa Y187, mutada para *Trp1*. A biblioteca de cDNA foi construída a partir de RNAs de células leveduriformes de *P. brasiliensis*. A cepa AH109, mutada para o gene *Leu2*, foi co-transformada com os cDNAs e o vetor de expressão pGADT7-Rec, que contém o gene *Leu2*, permitindo seleção

em meio mínimo sem leucina. Através de recombinação homóloga *in vivo* os cDNAs foram clonados em fase de leitura com o domínio GAL4 de ativação transcricional presente no pGADT7-Rec. Posteriormente, as cepas transformadas Y187 e AH109 foram inoculadas em um mesmo sistema para promover a diploidia (*mating*). O rastreamento das interações positivas foi feito em meio mínimo sem os aminoácidos triptofano, leucina, adenina e histidina. Para a identificação dos genes que interagem com CTR3, os clones provenientes de interação positiva foram seqüenciados e as seqüências obtidas foram comparadas com bancos de dados de proteínas, utilizando-se a ferramenta BLASTX (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990).

Tabela 06 – Interações preditas de *PbCTR3* com outras moléculas: resultados obtidos pelo sistema de duplo-híbrido em leveduras

Gene (Possíveis interações)	Organismo/Número de Acesso	Valor de <i>e-value</i>	Redundância (número de clones obtidos)
		5e-18	2
Transportador de Zinco/Ferro	<i>Ajellomyces capsulatus</i> HCAG_02989		
Hidrolase metal-dependente	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	8e-11	2
Transportador de Ca ²⁺ /Na ⁺	<i>Coccidioides immitis</i> CIMG_07493	4e-21	1

Perspectivas

Co-imunoprecipitação *in vitro*

As interações positivas do transportador de cobre de alta afinidade de *P. brasiliensis* com o Transportador de Zinco/Ferro, Hidrolase metal-dependente e Transportador de $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ *in vivo* serão confirmadas *in vitro* em sistema comercial de co-imunoprecipitação Matchmaker CO-IP (Clontech Laboratories, Inc.). Os vetores de expressão utilizados no sistema de duplo híbrido, pGBKT7 e pGADT7-Rec, possuem promotores para T7 RNA polimerase, e o epítipo c-Myc e Hemaglutinina (HA), respectivamente. Serão utilizados para a transcrição e tradução *in vitro* de CTR3 ligada à c-Myc e das proteínas da biblioteca ligadas à HA, em sistema contendo ^{35}S -Metionina. Os produtos obtidos serão incubados com o anticorpo monoclonal anti-c-Myc. Posteriormente será feita incubação com esferas de proteína A e eluição das proteínas através de fervura. As amostras eluídas serão submetidas à eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Após tratamento, o gel de poliacrilamida será exposto à filme de raio X à temperatura ambiente.

A identificação de proteínas que tenham interação *in vivo* com o transportador de cobre de alta afinidade no sistema de *S. cerevisiae* poderá auxiliar na compreensão do papel da proteína na biologia de *P. brasiliensis*.

Anexo X. 2: Obtenção de anticorpo policlonal anti-PbCTR3 e Western blot

Produção de peptídeo sintético e do anticorpo policlonal anti-PbCTR3

Análises de hidropatia da sequência de aminoácidos correspondente a proteína *PbCTR3* foi realizada utilizando-se o algoritmo Prosite/Expasy (<http://www.expasy.org/prosite>) (Hofmann *et al.*, 1999), com objetivo de se identificar as regiões hidrofílicas da molécula, para síntese de um peptídeo sintético (**Figura 14**). Com base nas análises, foi identificada uma região hidrofílica da molécula, que corresponde do aminoácido 90 até o 130. Essa região com 41 aminoácidos (**Figura 15**) foi selecionada para a síntese do peptídeo que foi produzido pela InvitrogenTM, Life Technologies, seguindo o protocolo do fabricante.

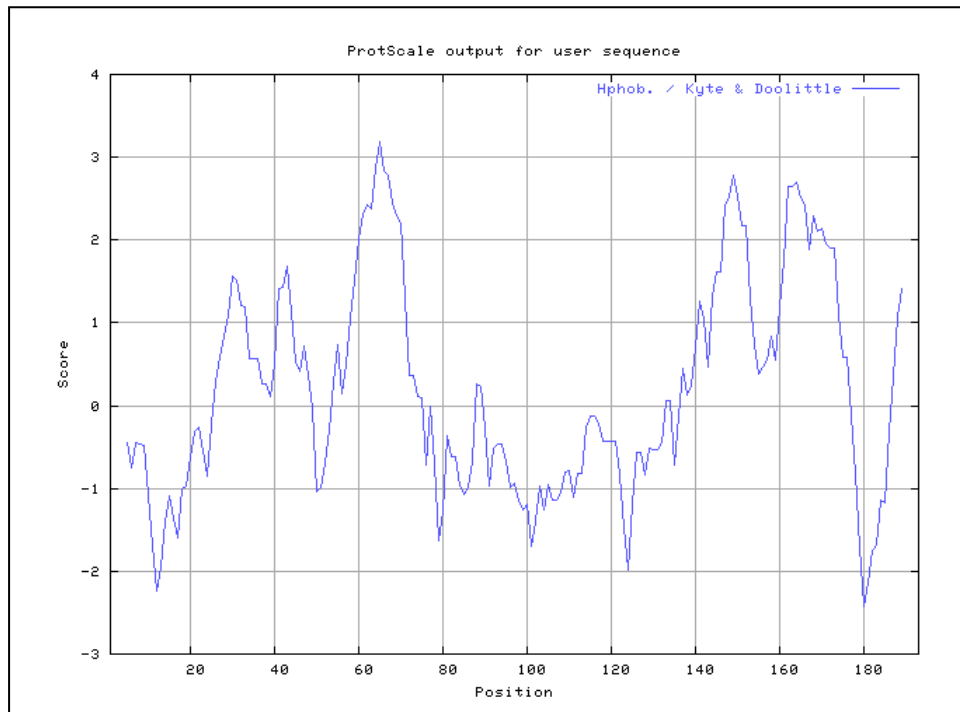


Figura 14: Gráfico correspondente a análise de hidropatia da molécula *PbCTR3*, gerado pelo algoritmo expasy (<http://www.expasy.org/prosite>) (Hofmann *et al.*, 1999), sendo considerado hidrofílicas as regiões com score ≤ 1 .

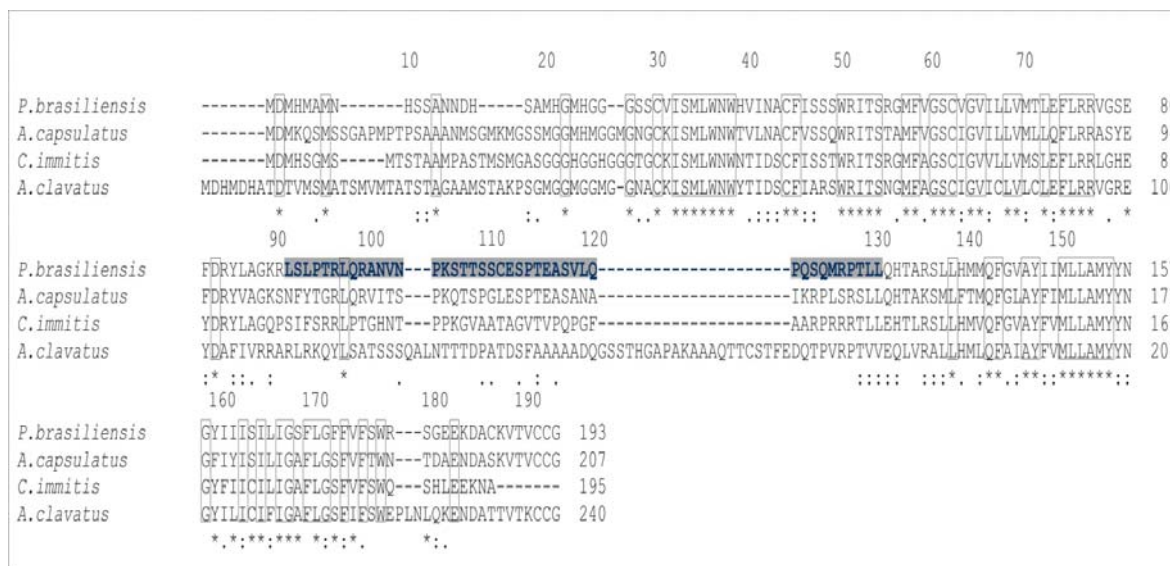


Figura 15: Sequência deduzida de aminoácidos de *PbCTR3* com proteínas homólogas, após análise comparativa no programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990). A região marcada em cinza corresponde a selecionada para síntese do peptídeo. As proteínas homólogas à provável sequência de *PbCTR3* são: *P. brasiliensis* (número de acesso no GenBank: DQ534496); *A. capsulatus* (número de acesso no GenBank: ABF22674); *C. immitis* (número de acesso no GenBank: XP001240196); *A. clavatus* (GenBank accession number XP001272812). Posições de identidade completa são indicadas com asterisco (*), dois pontos (:) indicam substituições conservadas e um ponto (.) indica uma substituição semiconservada. As posições mais conservadas estão marcadas por retângulos.

O peptídeo sintético foi utilizado para imunização em camundongos, utilizando adjuvante de Freund. Três imunizações foram realizadas com intervalo de 15 dias. Após as imunizações, o soro foi retirado, alíquotado e estocado a -20°C. O soro pré-imune foi obtido antes da primeira imunização.

Obtenção de extratos protéicos de *P. brasiliensis* e Western blot

Extratos protéicos de células leveduriformes e micelianas de *P. brasiliensis* foram obtidos como descrito por Fonseca *et al.*, (2001), por trituração mecânica das células congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente homogeneizadas em tampão de extração (20 mM Tris-HCl, 2mM CaCl₂, pH 8.8). Extratos protéicos de membrana de células leveduriformes de *P. brasiliensis* também foram obtidos seguindo protocolos adaptados a partir dos protocolos descritos por Bruneau *et al.*, (2001) e López-Villar *et al.*, (2006). Células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram lavadas com PBS1X e após centrifugação a 3.500xg, foram ressuspensas em tampão Tris-HCl 200 mM, pH 7,0. As células foram lisadas com pérolas de vidro no vórtex durante 30 min. Após a lise, as células foram centrifugadas a 3.500xg por 15 min e o sobrenadante coletado. O sobrenadante foi centrifugado a 100.000xg por 1 h. Os precipitados formados foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0, com um coquetel de inibidores de proteases.

Experimentos de *Western blot* foram realizados após fracionamento das proteínas (30 µg) em gel desnaturante de poliacrilamida e transferência para membrana de nitrocelulose por 3h à 4 °C. A membrana foi incubada com tampão de bloqueio (leite desnatado a 5% em PBS 1X) por 3h à 4 °C. Foram realizadas três lavagens de 10 min com tampão PBS e Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e a membrana foi incubada por duas horas na presença do anticorpo primário (anticorpo policlonal anti-*PbCTR3* na concentração de 1:8.000 em PBS-T). Posteriormente incubou-se a membrana com o anticorpo secundário comercial anti-camundongo marcado com fosfatase alcalina (na concentração de 1:2000 em PBS-T por 1 h). A reação foi revelada com solução de substrato cromogênio para fosfatase alcalina contendo BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) e NBT (nitro azul de tetrazol) (Sigma Aldrich).

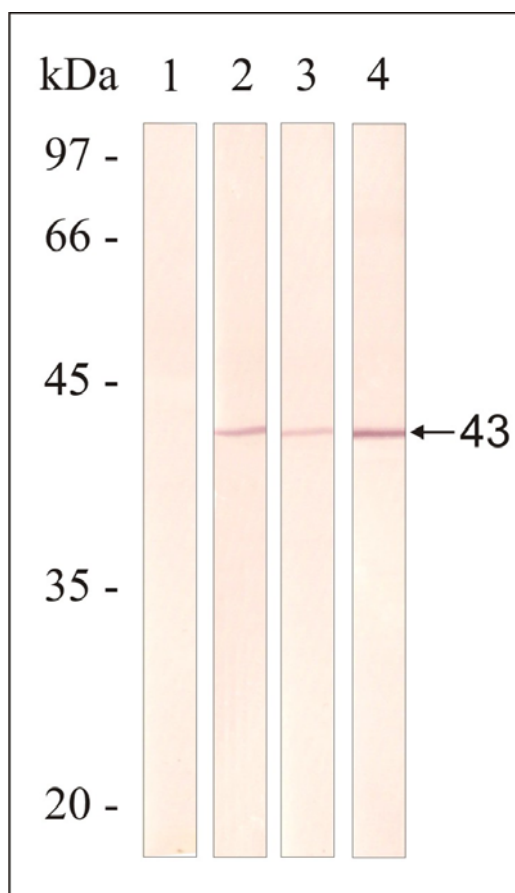


Figura 16: Análise por Western blot do transportador de cobre de alta afinidade (*PbCTR3*) de *P. brasiliensis*. As proteínas foram fracionadas por eletroforese em gel unidimensional, transferidas para membrana de nitrocelulose e detectadas pelo anticorpo policlonal anti- *PbCTR3* de *P. brasiliensis* na concentração de 1:8000. Após reação com anticorpo anti-camundongo secundário comercial marcado com fosfatase alcalina na concentração de 1:2000 em PBS-T por uma hora; a reação foi revelada com solução de substrato cromogênio para fosfatase alcalina contendo BCIP e NBT. **Linha 1:** Western blot utilizando extrato total de *P. brasiliensis* fase leveduriforme reagido com soro pré-imune. **Linha 2:** extrato protéico de células leveduriformes reagido com anticorpo anti-*PbCTR3*. **Linha 3:** extrato protéico de células micelianas reagido com anticorpo anti-*PbCTR3*. **Linha 4:** extrato protéico de membrana de células leveduriformes reagido com anticorpo anti-*PbCTR3*. Os números à esquerda indicam marcadores de massa molecular.

Em todos os extratos protéicos de *P. brasiliensis* testados o anticorpo policlonal anti-*PbCTR3* reconheceu uma proteína de aproximadamente 43 kDa. Não houve reação com o soro pré-imune. Através de análises da seqüência deduzida *PbCTR3*, verificou-se que a mesma apresenta uma massa molecular predita de 21kDa. A provável explicação para a detecção de uma proteína de massa molecular com 43 kDa, por análise em *western blot*, é que *PbCTR3* seja glicosilada, pois a mesma apresenta um provável sítio de *N*-glicosilação (**Figura 8**). Ensaaios de deglicosilação de extrato protéico de *P. brasiliensis* serão realizados com a enzima endoglicosidase H, com o objetivo de verificar se a proteína imunodetectada de 43kDa de *P.brasiliensis* é uma forma glicosilada da proteína *PbCTR3* de 21 kDa.

Anexo X.3 – DEPÓSITO E PUBLICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS DE CDNA E GENE CODIFICANTES PARA O TRANSPORTADOR DE COBRE DE ALTA AFINIDADE (*PbCTR3*) NO BANCO DE DADOS DO NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI).



My NCBI [Sign In] [Register]

All Databases

PubMed

Nucleotide

Protein

Genome

Structure

PMC

Taxonomy

Books

Search Nucleotide for

[Limits](#) [Preview/Index](#) [History](#) [Clipboard](#) [Details](#)

Format: [GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [More Formats](#)

[Download](#) [Save](#) [Links](#)

GenBank: EU530695.1

Paracoccidioides brasiliensis high affinity copper transporter (ctr3) gene, complete cds

[Features](#) [Sequence](#)

LOCUS EU530695 1655 bp DNA linear PLN 05-APR-2008
 DEFINITION Paracoccidioides brasiliensis high affinity copper transporter (ctr3) gene, complete cds.

ACCESSION EU530695
 VERSION EU530695.1 GI:171466742

KEYWORDS .
 SOURCE Paracoccidioides brasiliensis
 ORGANISM [Paracoccidioides brasiliensis](#)
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
 Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Onygenales; mitosporic
 Onygenales; Paracoccidioides.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1655)
 AUTHORS Santos,R.S., Bailao,A.M., Castro,N.S., Borges,C.L. and Soares,C.M.A.

TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (29-FEB-2008) Departamento de Bioquimica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goias, Laboratorio de Biologia Molecular, ICB 2, Campus 2, Goiania, Goias 74001-970, Brazil

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1655
 /organism="Paracoccidioides brasiliensis"
 /mol_type="genomic DNA"
 /db_xref="taxon:121759"
[gene](#) 1..1655
 /gene="ctr3"
[mRNA](#) join(1..517,648..678,761..1181,1267..1655)
 /gene="ctr3"
 /product="high affinity copper transporter"
[CDS](#) join(422..517,648..678,761..1181,1267..1300)
 /gene="ctr3"
 /codon_start=1
 /product="high affinity copper transporter"
 /protein_id="ACB46531.1"
 /db_xref="GI:171466743"
 /translation="MDMHMAMNHSSANNNDHSAMHGMMGGSSCVISMLWNWHVINACF
 ISSSWRITSRGMFVGSVGVILLVMTLEFLRRVGSEFDRYLAGKRLSLPTRLQRANVN
 PKSTTSSCESPTASVLQPQSMRPTLLQHTARSLHMMQFGVAYIIMLLAMYNGYI
 IISILIGSFLGFFVFSWRSGEKDKVTVCCG"

ORIGIN
 1 gcacgaggat tacctttcct gtattatcaa caagcttaga gaatattctg ctcaaatcaa
 61 ctcaccatag gatattgca cgtgccaaga tccaatgagc caggttctgc cgaactcgat
 121 cccttggggc gatccatggg tcgatatgca acaaactttg agctgcacat ctccagcgc
 181 cgtggtgatc gcttcccggc aagtctaaaa tatggcaggg gaagtataaa tgaggcctgt
 241 gactcctgct gctccaaaat ttgtacaatt tgccatgac gaggatttag tccaatacac
 301 agcctcccaa cctccttgac ttttgccaaa gcacataact tggattgttt ctttgttaca
 361 tcgcgaacct tgctgectgc gtcgctcttt ttaagagagc gcaacatttc gcaccgaaaa
 421 gatggatatg catatggcga tgaaccactc ttcggcaaac aatgatcact ccgcatgca
 481 tggaatgcac gcgcgcggtg gctcctgctg gatttctgta tgtggcagcc tccttacgag
 541 aaagggggaa acaacagtga tttgccagcg ggatcgctgc aggctgtagt acaggctctg
 601 ggggtgtgagg tgtgaggtgt ggagctgaca aaattggttt tcattagatg ctttggatt
 661 ggcatgtcat caatgectgt atgtccatcg accctccaaa atcctcattt tgatttgatt
 721 taatttggtt tgctaactct tttttaactg tttttgatag gcttcatttc ctcatcgtgg
 781 agaattacat ctagaggaat gttttagagg tcatgtgtag gcgtcatcct cctcgtcatg
 841 actctcgagt tcctccgacg ggtcggcagt gaattcgaca ggtatctcgc tgggaaacgc
 901 ttgagctctc cgaccgcctc gcagcggggc aacgtgaacc cgaagtcgac aaccagttcc
 961 tgtgaaagtc cgactgaagc atctgtgcta cagccacaat ctgagatgag acctacactt
 1021 cttcagcaca ctgcccgtc gctgcttcac atgatgcaat tcggagttgc ttacattatc
 1081 atgctgctgg ccatgtacta caacgggtac ataactcatt cgatcttgat aggatctttc
 1141 ctaggctttt ttgtgttttc atggagatca ggcgaagaa agtgagtaaa ctaatatttc
 1201 tgtgtggtga gggggcattt tccttatatt agagagctgc tgatgcgaaa gttattacta
 1261 tactagggac gcctgcaaag taactgtctg ttgctggttag caccaaaaaa aaggctctgg
 1321 catttatatt tgcttactgc aatttcgata tcgaaatagt tggaaagatg agaacatga
 1381 gtgggagggg atcaattggt acatgtaatg tattctacat acatgtgccc ttgtaaataa
 1441 tgtataaatg cgtctctgat gcattctgag tcaactcgat gtcttccatt tagacatttt
 1501 cctccttaca tgactctttt tattaataat cagtcaaaa ggcaaacagt ggtgatgca
 1561 tactacttcc aaacattttc tttattttt gatgatttta aacatctgag tagttagtaa
 1621 aactctattc tcatctatag attatgccac aatac

//

Change Region Shown

Customize View

Sequence Analysis Tools

[BLAST Sequence](#)

[Pick Primers](#)

Recent Activity

[Turn Off](#) [Clear](#)

Paracoccidioides brasiliensis high affinity copper transporter (ctr3) gene, copper paracoccidioides s... (2) [Nucleotide](#)

All links from this record

[Protein](#)

[Taxonomy](#)

[Related Sequences](#)

[Write to the Help Desk](#)

[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

[Department of Health & Human Services](#)

[Privacy Statement](#) | [Freedom of Information Act](#) | [Disclaimer](#)



My NCBI [Sign In] [Register]

All Databases

PubMed

Nucleotide

Protein

Genome

Structure

PMC

Taxonomy

Books

Search Nucleotide for

[Limits](#) [Preview/Index](#) [History](#) [Clipboard](#) [Details](#)

Format: [GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [More Formats](#)

[Download](#) [Save](#) [Links](#)

GenBank: DQ534496.1

Paracoccidioides brasiliensis high affinity copper transporter mRNA, complete cds

[Features](#) [Sequence](#)

LOCUS DQ534496 1389 bp mRNA linear PLN 12-JUN-2006
 DEFINITION Paracoccidioides brasiliensis high affinity copper transporter mRNA, complete cds.
 ACCESSION DQ534496
 VERSION DQ534496.1 GI:108597848
 KEYWORDS .
 SOURCE Paracoccidioides brasiliensis
 ORGANISM [Paracoccidioides brasiliensis](#)
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Onygenales; mitosporic Onygenales; Paracoccidioides.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1389)
 AUTHORS Bailao,A.M., Santos,R.S., Borges,C.L., Felipe,M.S., Pereira,M. and Soares,C.M.A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (10-MAY-2006) Laboratorio de Biologia Molecular, Universidade Federal de Goias, ICB 2, Campus 2, Goiania, Goias 74001-970, Brazil
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1389
 /organism="Paracoccidioides brasiliensis"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:121759"
 CDS 422..1003
 /codon_start=1
 /product="high affinity copper transporter"
 /protein_id="ABF93409.1"
 /db_xref="GI:108597849"
 /translation="MDMHMAMNHSSANNNDHSAMHGMHGGGSSCVISMLWNWHVINACF
 ISSSWRITSRGMFVGSVCVGVILLVMTLEFLRRVGFSEFDRLAGKRLSLPTRLQRANVN
 PKSTTSSCESPTEASVLQPSQMRPTLLQHTARSLHMMQFGVAYIIMLLAMYNGYI
 IISILIGSFLGFFVFSWRSGEKDACKVTVCCG"

ORIGIN

```

1 gcacgaggat tacctttcct gtattatcaa caagcttaga gaatattctg ctcaaatcaa
61 ctaccatag gatattgcca cgtgccaaaga tccaatgagc caggttctgc cgaactcgat
121 cccttggggc gatccatggg tcgatatgca acaactttg agctgcacat cttccagcgc
181 cgtggtgac gcttcccggc aagtctaaaa tatggcaggg gaagtataaa tgaggccggt
241 gactcctgct gctccaaaat ttgtacaatt tgccatgcac gaggatttag tccaatacac
301 agcctcccaa cctccttgac ttttgccaaa gcacataact tggattgttt ctttgttaca
361 tcgcaaacct tgctgcctgc gtcgctcttt ttaagagagc gcaacatttc gcaccgaaaa
421 gatggatag catatggcga tgaaccactc ttccggcaaac aatgatcact ccgccatgca
481 tggaatgcac ggcggcggta gctcctgcgt gatttctatg ctttggattt ggcatgtcat
541 caatgcctgc ttcatttccct catcgtggag aattacatct agaggaatgt ttgtagggtc
601 atgtgtaggc gtcacctcct tcgctcatgac tctcgagttc ctccgacggg tcggcagtgga
661 attcgacagg tatctcgctg ggaacgcctt gactctccc acccgctgc agcgggcgaa
721 cgtgaaccgg aagtcgacaa ccagttcctg tgaaagtccg actgaagcat ctgtgtaca
781 gccacaatct cagatgcgac ctacacttct tcagcacact gcccgctcgc tgcttccat
841 gatgcaatc ggagttgctt acattatcat gctgctggcc atgtactaca acgggtacat
901 aatcatttgc atcttgatag gatctttcct aggccttttt gtgttttcat ggagatcagg
961 cgaagaaaag gacgcctgca aagtaactgt ctgttgccgt tagcaccaaa caaaagggtc
1021 tggcatttat atttgcttac tgcaatttgc atatcgaaat agttggaaa atgagaaaaca
1081 tgagtgggag gggatcaatt gttacatgta atgtattcta catacatgtg cccttgtaaa
1141 taatgtataa atgcgtctct gatgcattct gactcaactc gatgtcttcc atttagacat
1201 tttcctcctt acatgactct ttttattaat aatcagtcac aaggggcaaac agtggtgatg
1261 cgatactact ttcaaacatt ttctttatct tttgatgatt ttaaacaatc gagtagttag
1321 taaaactcta ttctcatcta tagattatgc cacaatacaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa
1381 aaaaaaaaa
    
```

//

Change Region Shown

Customize View

Sequence Analysis Tools

[BLAST Sequence](#)
[Pick Primers](#)

Recent Activity

[Turn Off](#) [Clear](#)

Paracoccidioides brasiliensis high affinity copper transporter mRNA,
 Paracoccidioides brasiliensis high affinity copper transporter (ctr3)
[copper paracoccidioides s... \(Nucleotide\)](#)

All links from this record

[Protein](#)
[Taxonomy](#)
[Related Sequences](#)

[Write to the Help Desk](#)

[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

[Department of Health & Human Services](#)

[Privacy Statement](#) | [Freedom of Information Act](#) | [Disclaimer](#)

X.4 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O MESTRADO

X. 4.1 – ARTIGO CIENTÍFICO (CO-AUTORIA):

Dantas, S.F.I.M., Rezende, T.C.V., Bailão, A.M., Taborda, C.P., **Santos, R.S.**, Castro, K.P., Soares, C. M. A. (2009). Identification and characterization of antigenic proteins potentially expressed during the infectious process of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes and infection*.

1 **Identification and characterization of antigenic proteins potentially expressed during**
2 **the infectious process of *Paracoccidioides brasiliensis***

3

4 **Sabrina Fonseca Ingênilo Moreira Dantas^a, Tereza Cristina Vieira de Rezende^a,**
5 **Alexandre Melo Bailão^a, Carlos Pelleschi Taborda^b, Rodrigo da Silva Santos^a, Kelly**
6 **Pacheco de Castro^a, Célia Maria de Almeida Soares^{a*}.**

7

8 ^a-Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal
9 de Goiás, 74001-970, Goiânia, GO, Brazil.

10 ^b- Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, Universidade de São
11 Paulo, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil.

12

13 *-Corresponding author: Célia Maria de Almeida Soares, Laboratório de Biologia
14 Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, ICBII, Campus II, Universidade Federal de
15 Goiás, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brazil. Phone/fax: 55-62-35211110.

16 e-mail:celia@icb.ufg.br

17

18 **Abstract**

19 *Paracoccidioides brasiliensis* causes paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic
20 mycosis presenting clinical manifestations ranging from mild to severe forms. A *P.*
21 *brasiliensis* cDNA expression library was produced and screened with pooled sera from PCM
22 patients adsorbed against antigens derived from in vitro-grown *P. brasiliensis* yeast cells.
23 Sequencing DNA inserts from clones reactive with PCM patients sera indicated 35 open
24 reading frames presenting homology to genes involved in metabolic pathways, transport,
25 among other predicted functions. The complete cDNAs encoding aromatic L-amino acid
26 decarboxylase (*Pbddc*), lumazine synthase (*Pbls*) and a homologue of the high affinity copper
27 transporter (*Pbctr3*) were obtained. Recombinant proteins *PbDDC* and *PbLS* were obtained; a
28 peptide was synthesized for *PbCTR3*. The proteins and the synthetic peptide were recognized
29 by sera of patients with confirmed PCM and not by sera of healthy patients. Using the vivo-
30 induced antigen technology (IVIAT) we identified immunogenic proteins expressed at high
31 levels during infection. Quantitative real - time RT-PCR demonstrated high transcript levels
32 of *Pbddc*, *Pbls* and *Pbctr3* in yeast cells infecting macrophages. Transcripts in yeast cells
33 derived from spleen and liver of infected mice were also measured by qRT-PCR. Our results
34 suggest a putative role for the immunogenic proteins in the infectious process of *P.*
35 *brasiliensis*.

36 Keywords: *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*; IMMUNOGENIC PROTEINS;
37 INFECTIOUS PROCESS; DOPA DECARBOXYLASE; LUMAZINE SYNTHASE ; HIGH
38 AFFINTIY COPPER TRANSPORTER.

39 Abbreviations: BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate; CTR3, high affinity copper
40 transporter ; DDC, aromatic - L- amino acid decarboxylase; IPTG, Isopropyl- β -D-
41 thiogalactopyranoside; IVIAT, in vivo-induced antigen technology LS, lumazine synthase;

42 NBT, nitroblue tetrazolium; *Pb*, *Paracoccidioides brasiliensis*; PCM,

43 Paracoccidioidomycosis; TPI, triosephosphate isomerase.

44

45 **1. Introduction**

46

47 *Paracoccidioides brasiliensis* causes paracoccidioidomycosis (PCM), a human
48 systemic granulomatous disease, prevalent in South America [1]. The fungus is thermo
49 dimorphic and causes by inhalation of airborne propagules of the mycelia phase, which reach
50 the lungs and differentiates into the yeast phase [2].

51 Although the disease process is well characterized, the fungal expression of genes in
52 vivo is poorly explored. During disease, *P. brasiliensis* must adapt to a range of environments
53 and survival in any one niche should require the differential expression of genes. The in vivo
54 gene expression pattern of *P. brasiliensis* has been examined by our laboratory by
55 transcriptome analysis [3-5]. A wide array of genes involved in nutrient acquisition, melanin
56 synthesis, adhesion, stress response, general metabolism were induced and have been
57 identified.

58 With the purpose of identifying antigenic proteins potentially expressed during the
59 fungal infectious process, here we applied the in vivo-induced antigen technology (IVIAT).
60 IVIAT has been used to identify genes expressed during human infection by several
61 microorganisms [6-11]. A *P. brasiliensis* cDNA expression library was screened in order to
62 identify clones reactive with sera of PCM patients. Specifically, we hypothesized that by
63 using the IVIAT immunological screening, we could identify proteins that play a role during
64 fungal infection.

65 Screening of the cDNA library resulted in the identification of 35 genes, putatively
66 playing a role in the fungus-host interaction. The cDNAs, encoding aromatic - L- amino acid
67 decarboxylase (DDC, EC 4. 1. 1. 28), lumazine synthase (LS, EC 2. 5. 1. 9) and high affinity
68 copper transporter (CTR3) orthologues of *P. brasiliensis* were selected for further analysis.
69 The recombinant proteins (*PbDDC* and *PbLS*) and a synthetic peptide (*PbCTR3*) were

70 obtained and showed strong reactivity with sera of PCM patients. The predictable expression
71 of those transcripts was evaluated by quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR) in models of
72 infection. The results suggest a role in the pathogen-host interaction. Due to the relevance of
73 melanin in pathogenesis of microorganisms we investigated the involvement of *PbDDC* in
74 this pathway; results demonstrated correlation between the increase of melanin and the
75 enzyme expression in fungal yeast cells.

76

77 **2. Materials and methods**

78

79 **2.1. *P. brasiliensis* isolate growth conditions and differentiation assays**

80 *P. brasiliensis* Pb01 isolate (ATCC-MYA-826) was cultivated in semi-solid Fava
81 Netto's medium [1% (w/v) peptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 0.3% (w/v) proteose peptone,
82 0.5% (w/v) beef extract, 0.5% (w/v) NaCl, 1% (w/v) agar, pH 7.2] at 36 °C in the yeast form
83 and at 22 °C, for its mycelia phase.

84

85 **2.2. Adsorbing PCM patients sera to *P. brasiliensis* grown in vitro**

86 Human sera were collected from eleven patients with well-documented PCM in
87 chronic disease phase and pooled. The serum samples were selected at the time of diagnosis
88 from patients with mycological confirmed disease. Human control sera obtained from eleven
89 healthy individuals were pooled.

90 A mixture of equal volumes of sera of PCM patients was diluted with *Escherichia coli*
91 cells lysate and the same volume of PBS 1X. The mixture was incubated at 37 °C for 1 h, and
92 centrifuged at 10,000 x g, 4 °C during 20 min. In the second stage, the supernatant was
93 incubated during 1 h at 37 °C, with the same volume of a mixture containing protein extract
94 of *P. brasiliensis* yeast cells (100 µg/mL) and whole yeast cells. This mixture was centrifuged

95 at 10,000 x g, 4 °C for 20 min; the supernatant was collected. The efficiency of the incubation
96 was monitored by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and
97 Western blotting.

98

99 **2.3. Infection of mice with *P. brasiliensis* and RNA extraction**

100 Female BALB/c mice, 8 to 12 weeks old, were inoculated with 1×10^7 yeast cells of
101 *P. brasiliensis*. In brief, yeast cells suspension at the 7th day of in vitro growth were washed
102 in PBS 1X and inoculated intraperitoneally in mice. Matched groups of four animals were
103 injected with sterile PBS and used as uninfected controls. The animals were killed on the 15th
104 day after infection. The livers and spleens were removed. Serial dilutions of the lysate were
105 plated in infusion brain and heart (BHI) medium supplemented with 4% (v/v) of fetal bovine
106 serum (FBS) and the plates were incubated at 36 °C for 7 days. The recovered cells were
107 submitted to total RNA extraction by using Trizol reagent (Invitrogen™, Life Technologies),
108 according to the manufacturer's instructions. Total RNA from *P. brasiliensis* yeast cells and
109 mycelium grown in vitro, in the same medium, was also obtained.

110

111 **2.4. Construction of a cDNA expression library of *P. brasiliensis***

112 For the construction of a cDNA expression library the RNA of yeast cells recovered
113 from mice liver on the 15th day after infection was purified by using the Poly (A) Quick®
114 mRNA isolation kit (Stratagene, La Jola, CA). The cDNA library was constructed by using
115 the SUPERSCRIP™ plasmid system with GATEWAY® technology for cDNA synthesis and
116 cloning.

117

118 **2.5. Immunological screening of the cDNA library, identification of inserts and** 119 **prediction of function of the identified antigens**

120 The pooled sera were used in the screening of the cDNA library. An aliquot of the
121 cDNA library was diluted and spread onto LB medium plates containing ampicillin (100
122 µg/ml) to produce 300-600 colonies per plate. The bacterial colonies were grown at 37 °C
123 overnight. The colonies were held up by using nitrocellulose membranes, replica plated onto
124 LB containing ampicillin and 1mM of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), and
125 incubated overnight at 37 °C. The colonies grown onto membrane were exposed to
126 chloroform for 20 min. Following washing and blocking of membranes, they were incubated
127 with the adsorbed sera (1:1,000 diluted) in PBS 1X, 0.1% (v/v) Tween 20, at 4 °C for 18 h.
128 The induced proteins reacting with antibodies in the sera were detected by using peroxidase-
129 conjugated goat, anti-human IgG (1:2,000 diluted) and revealed with the ECL Advance™
130 Western blotting detection kit (GE Healthcare, Amersham Biosciences). Reactive cDNAs
131 were identified by their position on the master plate; each positive cDNA was isolated at least
132 by two additional plating and reaction to the pooled sera.

133 We recovered plasmid DNA from 35 positive clones and sequenced the inserts from
134 their 5' end by employing the standard fluorescence labeling DYEnamic™ ET dye terminator
135 kit (GE Healthcare). An automated DNA sequence analysis was performed in a MegaBACE
136 1000 DNA sequencer (GE Healthcare). The proteins encoded in the cloned cDNAs were
137 compared against the GenBank non-redundant (nr) database from the National Center for
138 Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the BLAST X algorithm
139 and against *P. brasiliensis* genome database
140 (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis
141 /MultiHome.html).

142 **2.6. Cloning of *P. brasiliensis* aromatic-L-amino-acid decarboxylase (*Pbddc*) and**
143 **lumazine synthase (*Pbls*) cDNAs, expression and purification of the recombinant**
144 **proteins**

145 Oligonucleotide primers were designed to amplify the 1.6 kb and 525 bp cDNAs
146 containing the complete coding regions of *Pbddc* and *Pbls*, respectively. The 1.6 kb and 525
147 bp amplicons were gel-excised and cloned into pGEX-4T-3 (GE Healthcare) to yield the
148 constructs pGEX-4T3-*ddc* and pGEX-4T-3-*ls*. The recombinant plasmids were used to
149 transform *E. coli*, according to standard procedures [12]. The cells were grown to an
150 absorbance of 0.6 at 600 nm and 0.5 mM IPTG was added to the growing cultures. After 16 h
151 incubation, at 15 °C, the bacterial cells were harvested, resuspended in PBS 1X, lysed by
152 sonication and the recombinant fusion proteins were cleaved by thrombin addition (10 U/mg
153 fusion protein).

154

155 **2.7. Production of polyclonal antibody anti-PbDDC**

156 The recombinant *PbDDC* was used to generate specific rabbit polyclonal serum.
157 Rabbit pre immune serum was obtained. The purified protein (300 µg) was injected into
158 rabbit with Freund's adjuvant three times at 2-week intervals.

159

160 **2.8. Western blotting of the recombinant proteins with sera of PCM patients**

161 The recombinant proteins were fractionated by SDS-PAGE [13]. The gels were either
162 stained with Coomassie blue or blotted onto nitrocellulose membranes that were blocked with
163 5% nonfat skim milk and reacted with sera from PCM patients or from healthy individuals
164 (1:1,000 diluted). The secondary antibody was alkaline phosphatase coupled anti-human IgG.
165 The reactions were developed with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate and nitroblue
166 tetrazolium (BCIP/NBT).

167

168 **2.9. Preparation and infection of mice macrophages by *P. brasiliensis* yeast cells**

169 Bone marrow-derived macrophages were obtained by flushing the femurs of 4-12
170 weeks old female C57BL/6 mice [14]. The prepared cells were cultured at 37 °C under 6%
171 CO₂ in RPMI 1640 medium (Biowhittaker, Walkersville, Md.) supplemented with 10% (v/v)
172 FBS, 1% (w/v) L-glutamine, 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol, 100 ng/mL granulocyte
173 macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), and 10 µg/mL of gentamicin. After 8 days
174 the non adherent cells were discarded and the remaining cells were washed twice with 10 mL
175 of Hank's Balanced Salt Solution (HBSS). The cells were treated with 10 µg/mL of dispase in
176 HBSS at 37 °C for 5 min. Further, macrophages were removed using a cell scraper and
177 washed in HBSS. Cells were centrifuged at 500 x g for 5 min, and resuspended in RPMI 1640
178 medium (supplemented as described above, minus GM-CSF) at a concentration of 1×10^6
179 cells/mL. *P. brasiliensis* yeast cells (5×10^6) were added to 2 mL of macrophage suspension
180 plated on 6 well plates. After 24 h of co-cultivation at 37 °C, the non-phagocytosed yeast cells
181 were discarded and the bottom cells were washed twice. The RNA of infected mice
182 macrophages and control macrophages were extracted using Trizol.

183

184 **2.10. Quantitative analysis of RNA transcripts encoding *Pbddc* , *Pbbs* and *Pbctr3* by**
185 **reverse transcription real-time PCR (qRT-PCR)**

186 The RNA of yeast cells, mycelium, infected macrophages and yeast cells derived from
187 infection of mice liver and spleen after 15 days were used in this analysis. Total RNAs treated
188 with DNase were reverse transcribed using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen)
189 and oligo(dT)₁₅ primer. qRT-PCR was performed in triplicate, with samples from three
190 independent experiments in the StepOnePlus™ real-time PCR system (Applied Biosystems,
191 Foster City, CA). The PCR thermal cycling was 40 cycles of 95°C for 15 sec; 60°C for 1 min.
192 The SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) was used as reaction mixture, added
193 of 10 pmol of each primer and 40 ng of template cDNA, in a final volume of 25 µl. A melting

194 curve analysis was performed to confirm a single PCR product. The data were normalized
195 with the ribosomal protein L34 amplified in each set of qRT-PCR experiments. A non
196 template control was included. A cDNA for a relative standard curve was generated by
197 pooling an aliquot of cDNA from each sample. The standard cDNA was serially diluted 1:5,
198 and a standard curve was generated using four samples from the pooled cDNA. Relative
199 expression levels of genes of interest were calculated using the standard curve method for
200 relative quantification [15].

201

202 **2.11. Dot blot analysis**

203 To analyze the melanin and DDC accumulation in yeast forms of *P. brasiliensis*, the
204 cells (1.5 g) were sub cultured in Mc Veigh-Morton liquid minimal medium (MMcMi) [16]
205 supplemented or not with 1.0 mM L-Dopa (Sigma) for 15 days at 36 °C. All cultures were
206 incubated in the dark to avoid photo polymerization of L-Dopa into melanin. The viability of
207 fungal suspensions was determined by staining with 0.01% (w/v) Trypan blue in PBS 1X. The
208 cells were collected by centrifugation at 5,000 x g for 5 min, frozen in liquid nitrogen and
209 disrupted by maceration. The cellular powder was centrifuged at 12,000 x g for 20 min. The
210 cellular extracts were vacuum spotted onto nitrocellulose membranes that were blocked and
211 reacted with the anti-melanin antibody of *Sporothrix schenckii* (1:1,000 diluted, kindly
212 provided by Dr Joshua D. Nosanchuck, Albert Einstein College of Medicine, New York) and
213 antibody anti-DDC (1:500 diluted). The anti-melanin secondary antibody was biotin anti-
214 mouse IgM (1:500 diluted) plus streptavidin-HRP (1:1,000 diluted) and the reactive bands
215 were developed with hydrogen peroxide and diaminebenzidine. The anti-DDC secondary
216 antibody was alkaline phosphatase coupled anti-rabbit IgG (1:2,000 diluted), and the reaction
217 was developed with BCIP/NBT. Dot blot analysis was also performed to assay the reactivity

218 of a peptide synthesized on basis on the deduced sequence of *PbCTR3* (Supplementary Fig.
219 3) to the serum of PCM patients. Reactions were performed as described above.

220

221 **3. Results**

222 **3.1. Identification of *P. brasiliensis* antigens by IVIAT**

223 We immuno-screened approximately 6,000 clones inducible in the *P. brasiliensis*
224 expression library. We identified 35 immuno-reactive clones representing 29 distinct *P.*
225 *brasiliensis* genes encoding proteins that were persistently reactive after at least three rounds
226 of screening. The predicted proteins encoded by the cDNAs are shown in Table 1. They are
227 implicated in cell metabolism, biogenesis of cellular components, transport, energy,
228 transcription, protein fate and signal transduction.

229

230 **3.2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of aromatic-L-amino-acid** 231 **decarboxylase (*PbDDC*) , lumazine synthase (*PbLS*) and high affinity copper** 232 **transporter (*PbCTR3*)**

233 We selected the cDNAs encoding *Pbddc* , *PbLS* and *Pbctr3* for further analysis. The
234 entire cDNA encoding *Pbddc* consisted of 2,371 bp and encoded a protein of 545 amino
235 acids, predicted molecular mass of 60 kDa and pI of 6.5. The cDNA sequence encoding
236 *PbDDC* had been deposited on GenBank under accession number ABH03461. The deduced
237 amino acid sequence displayed strong identity to DDCs of fungal origin. The alignment of
238 *PbDDC* with pathogenic fungi orthologues is presented in Supplementary Fig.1.

239 The analysis of *PbLS* showed a single open reading frame (ORF) with 174 amino acids
240 with a molecular mass prediction of 19 kDa and pI of 6.6. The cDNA and genomic sequences
241 encoding *PbLS* had been deposited on GenBank under accession numbers DQ081183 and

242 DQ186604, respectively. The sequence of amino acid encoding *PbLS* was compared with
243 orthologues of fungi (Supplementary Fig. 2).

244 The analysis of *Pbctr3* demonstrated a single ORF with 193 amino acids, with a
245 predicted molecular mass of 21 kDa and *pI* of 8.6 (Supplementary Fig. 3). The cDNA
246 encoding *Pbctr3* had been deposited on GenBank under accession number DQ534496.

247

248 **3.3. Reactivity of *PbDDC* , *PbLS* and *PbCTR3* to sera of PCM patients**

249 The expression of the recombinant *PbDDC* and *PbLS* was obtained. SDS-PAGE was
250 used to verify the composition of the cells lysates obtained from *E. coli* cells which had been
251 transformed with the plasmid constructs, as shown in Fig. 1A and 1B, lanes 1. After
252 induction with IPTG, 89-kDa and 48- kDa recombinant proteins were detected in the bacterial
253 lysates (Figs.1 A and B, lanes 2), respectively for *PbDDC* and *PbLS*, which included the
254 vector-encoded fusion protein at its N-terminus. The fusion proteins were cleaved by the
255 addition of thrombin protease (Figs. 1 A and B, lanes 3). As observed, highly purified
256 proteins were obtained, that migrated on SDS-PAGE as a single species of 60-kDa and 19-
257 kDa, for *PbDDC* and *PbLS*, respectively. A peptide was synthesized towards amino acids 90
258 to 130 of the deduced *PbCTR3* (Supplementary Fig. 3).

259 Five sera samples from PCM patients and five control sera samples were reacted with
260 the recombinant proteins *PbDDC* and *PbLS* and with the synthetic peptide of *PbCTR3* in
261 immunoblot assays (Figs. 1 C, D and E, respectively). Strong reactivity was observed with
262 sera of PCM patients (Figs. 1 C, D and E, lanes 1-5) and no cross-reactivity was observed
263 with control sera (Figs. 1 C, D and E, lanes 6-10).

264

265 **3.4. Assessment of the expression of *Pbddc*, *PbIs* and *Pbctr3* by reverse transcription** 266 **real-time PCR in models of infection**

267 The expression of the genes in a macrophage model of infection is shown in Fig. 2A.
268 In our study, the genes are induced in yeast cells, when compared to mycelia. During
269 macrophage infection it was detected overexpression of *Pbddc* and *Pbctr3*, when compared
270 to the expression in the mycelium and yeast cells after in vitro growth. Although expressed
271 during macrophage infection, *Pbls* was not upregulated in vivo relative to the highest level of
272 expression in vitro (Fig. 2A).

273 The expression of the genes was also evaluated by qRT-PCR analysis in yeast cells of
274 *P. brasiliensis* derived from infected mice liver and spleen (Fig. 2B). We have shown that
275 *Pbddc* is upregulated in vivo, with the expression occurring at 15 days post inoculation in
276 spleen, but not in liver (Fig. 2B). We have also shown that *Pbctr3* is upregulated in liver and
277 spleen (Fig. 2B). Of the genes characterized by qRT-PCR, *Pbls* was not overexpressed in vivo
278 relative to the highest level of expression in vitro (Fig.2B).

279

280 **3.5. Melanin accumulation in yeast cells of *P. brasiliensis***

281 We directed our experiments toward the analysis of melanin accumulation in *P.*
282 *brasiliensis*. The fungus was grown on a chemically defined medium supplemented or not
283 with L-Dopa (Fig. 3). The viability was of 62.5% and 75.7% respectively for yeast cells
284 grown in media enriched or not with L-Dopa (data not shown). Light microscopy (400X
285 magnification) shows darkly pigmented yeast cells in the presence of L-Dopa (Fig. 3A panel
286 2). The accumulation of melanin and DDC were higher when the fungus was grown in
287 medium supplemented with L-Dopa (Fig. 3 B and C, respectively). Loading control was
288 performed with the antibody to the recombinant triosephosphate isomerase [17].

289

290 **4. Discussion**

291 Our objective in the present work was uncovering antigenic proteins that could be
292 expressed during infection with *P. brasiliensis*. Sera from PCM patients were pooled and
293 reacted with in vitro grown *P. brasiliensis*. Antibodies that remain in these sera should be
294 reactive with proteins expressed by the pathogen during the natural infection, as described in
295 other organisms [6-11].

296 Screening of the *P. brasiliensis* cDNA library with sera from individuals with active
297 PCM resulted in the identification of 35 clones encoding putative immunogenic proteins.
298 Sequence analysis of the reactive clones in the present study identified genes varying from
299 cell metabolism, transport, energy, transcription, protein fate, signal transduction and control
300 of cellular organization, as well as unknown functions. Among the identified transcripts some
301 encoded molecules presumably present at the fungal cell wall such as high affinity copper
302 transporter, siderophore receptor, carboxylate/amino acid/amine transporter and ABC
303 transporter. Interestingly, some of the identified cDNAs encoded proteins described as
304 immunogenic in organisms, such as DDC [18], acetyl-CoA acetyltransferase [19], LS [20],
305 alcohol dehydrogenase [21]. LS is an enzyme of the family 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine
306 synthase, which catalyzes the penultimate step of synthesis of vitamin B₂ (riboflavin). Plants,
307 bacteria and fungi are vulnerable to inhibitors of the synthesis of riboflavin. The lack of such
308 a homolog in humans suggests that *PbLS* may serve as antifungal drug target, as described
309 [22].

310 To further confirm the validity of the screening strategy in identifying *P. brasiliensis*
311 antigens potentially relevant to the fungal infection, we selected *PbDDC*, *PbLS* and *PbCTR3*
312 for further analysis. The recombinant proteins *PbDDC* and *PbLS*, as well as the synthetic
313 peptide of *PbCTR3* were recognized by sera of PCM patients, validating the IVIAT strategy
314 here employed. LS is an immunogenic molecule and an useful marker in the serological
315 diagnosis of brucellosis in human beings and animals [23].

316 We selected *Pbddc*, *Pbls* and *Pbctr3* to follow with experiments concerning to gene
317 expression in models of infection. The transcripts encoding *Pbddc* and *Pbctr3* were
318 overexpressed in fungal yeast cells infecting macrophages and in cells derived from tissues of
319 infected mice. We detected overexpression of the transcript encoding *Pbddc* in yeast cells
320 derived from spleen and not in liver at 15 days postinoculation, which could reflect niche
321 regulation of genes in *P. brasiliensis* microenvironments, as described to fungi [24-25].
322 Noteworthy, *Pbctr3* was overexpressed in all analyzed conditions corroborating previous
323 transcriptome analysis from our laboratory [3]. This may not be surprising considering the
324 obvious necessity for upregulating copper acquisition during infection [26]. It has long been
325 established that invading pathogens must compete favorably for limited nutrients to both
326 establish and maintain a successful host infection. Studies indicate that copper modulates
327 critical virulence determinants. Genetic analysis in *Cryptococcus neoformans* has
328 demonstrated that a high affinity copper transporter and its corresponding transcriptional
329 regulator are required for infection of the brain [27]. Although expressed in liver and spleen at
330 15 days postinoculation, *Pbls* was not upregulated in vivo relative to the highest level of
331 expression in vitro. There are possible explanations for this result. The gene expression could
332 be induced earlier or later during the infectious process and we could have missed the time at
333 which the expression increased relative to the in vitro growth. Additionally, the amount of
334 RNA could not reflect the amount of protein if the gene regulation occurs at
335 posttranscriptional level. Further investigation will be required.

336 The fungus *P. brasiliensis* is known to make Dopa-melanin from L-Dopa [28-29]. The
337 production of melanin-like pigments by *P. brasiliensis* protects the fungus from phagocytosis
338 and increases its resistance to antifungal drugs [29]. We verified in this work a correlation
339 between increase in melanin accumulation and *PbDDC* in yeast cells incubated in the

340 presence of L-Dopa, which resulted in the presence of dark pigment by yeast cells. The results
341 suggest that *PbDDC* could be involved in the melanin biosynthesis pathway.

342 In conclusion, the present study has shown the successful application of IVIAT in the
343 identification of *P. brasiliensis* genes expressed during fungal infection. The identified genes
344 ranged from those involved in metabolic pathways to those with unknown function. The study
345 of the identified genes could improve our understanding of the adaptative mechanisms used
346 by *P. brasiliensis* in the infectious process.

347

348 **Acknowledgments**

349 This work at Universidade Federal de Goiás was supported by grants from FINEP, CNPq, and
350 SECTEC-GO, FAPEG.

351

352 **References**

353

354 [1] A. Restrepo, J.G. Mc Eween, E. Castaneda, The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*:
355 how far from solving the riddle?, *Med. Mycol.* 39 (2001) 233-241.

356

357 [2] E. Brummer, E. Castañeda, A. Restrepo, Paracoccidioidomycosis: an update, *Clin.*
358 *Microbiol. Rev.* 6 (1993) 89–117.

359

360 [3] A.M. Bailão, A. Schrank, C.L. Borges, V. Dutra, E.E.W.I. Molinari-Madlum, M.S. S.
361 Felipe, M.J.S. Mendes-Giannini, W.S. Martins, M. Pereira, C.M.A. Soares, Differential gene
362 expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: Representational
363 difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis, *Microbes*
364 *Infect.* 8 (2006) 2686-2697.

365

366 [4] A.M. Bailão, A. Shrank, C.L. Borges, J.A. Parente, V. Dutra, M.S.S. Felipe, R.B. Fiúza,
367 M. Pereira, C.M.A. Soares, The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast
368 cells is influenced by human plasma, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51 (2007) 43–57.

369

370 [5] M. Costa, C.L. Borges, A.M. Bailão, G.V. Meirelles, Y.A. Mendonça, S.F.I.M. Dantas;
371 F.P. Faria, M.S.S. Felipe, E.E.W.I. Molinari-Madlum, M.J.S.M. Giannini, R.B. Fiúza, W.S.
372 Martins, M. Pereira, C.M.A. Soares, Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis*
373 yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon
374 host interaction, *Microbiology* 153 (2007) 4194-4207.

375

- 376 [6] S. Cheng, C.J. Clancy, M.A. Checkley, M. Handfield, J.D. Hillman, A. Progulske-Fox,
377 A.S. Lewin, P.L. Fidel, M.H. Nguyen, Identification of *Candida albicans* genes induced
378 during thrush offers insight into pathogenesis, *Mol. Microbiol.* 48 (2003) 1275–1288.
379
- 380 [7] L. Hang, M. John, M. Asaduzzaman, E.A. Bridges, C. Vanderspurt, T.J. Kirn, R.K.
381 Taylor, D.J. Hillman, A. Progulske-Fox, M. Handfield, E.T. Ryan, S.B. Calderwood, Use of
382 in vivo-induced antigen technology (IVIAT) to identify genes uniquely expressed during
383 human infection with *Vibrio cholerae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100 (2003) 8508-8513.
384
- 385 [8] J. Richardson, J.C. Craighead, S.L. Cao, M. Handfield, Concurrence between the gene
386 expression pattern of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized aggressive
387 periodontitis and in human epithelial cells, *J. Med. Microbiol.* 54 (2005) 497-504.
388
- 389 [9] M. John, I.T. Kudva, R.W. Griffin, A.W. Dodson, B. McManus, B. Krastins, D. Sarracino,
390 A. Progulske-Fox, J.D. Hillman, M. Handfield, P.I. Tarr, S.B. Calderwood, Use of in vivo-
391 induced antigen technology for identification of *Escherichia coli* O157:H7 proteins expressed
392 during human infection, *Infect. Immun.* 73 (2005) 2665-2679.
393
- 394 [10] K.Y. Salim, D.G. Cvitkovitch, P. Chang, D.J. Bast, M. Handfield, J.D. Hillman, J. C.
395 Azavedo, Identification of group A *Streptococcus* antigenic determinants upregulated in vivo,
396 *Infect. Immun.* 73 (2005) 6026-6038.
397
- 398 [11] J.B. Harris, A. Baresch-Bernal, S.M. Rollins, A. Alam, R.C. LaRocque, M. Bikowski,
399 A.F. Peppercorn, M. Handfield, J.D. Hillman, F. Qadri, S.B. Calderwood, E. Hohmann, R.F.
400 Breiman, W.A. Brooks, E.T. Ryan, Identification of in vivo-induced bacterial protein antigens

401 during human infection with *Salmonella enterica serovar Typhi*, *Infect. Immun.* 74 (2006)
402 5161-5168.

403

404 [12] J. Sambrook, D.W. Russel (Eds), *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring
405 Harbor, New York, 2001.

406

407 [13] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of head of
408 bacteriophage T₄, *Nature* 227 (1970) 680-685.

409

410 [14] A.H. Fortier, L.A. Falk, in: J.E. Coligan, B.E. Bierer, D.H. Margulies, E.M. Shevach,
411 W. Strober, P. Brown (Eds.), *Isolation of mice macrophages*, *Current Protocols in*
412 *Immunology*, 2007, pp. 14.1.1-9.

413

414 [15] A.L. Bookout, C.L. Cummins, D. J. Mangelsdorf, J.M. Pesola, M.F. Kramer, in: F. M.
415 Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl (Eds.),
416 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 2006, pp. 15.8.1-28.

417

418 [16] A. Restrepo, B. Jiménez, Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a
419 chemically defined culture medium, *J. Clin. Microbiol.* 12 (1980) 279-281.

420

421 [17] L.A. Pereira, S.N. Bão, M.S. Barbosa, J.L.M. Silva, M.S.S. Felipe, J.M. Santana, M.J.S.
422 Mendes-Giannini, C.M.A. Soares, Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis*
423 triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesion function, *FEMS Yeast Res.* 8
424 (2007) 1381–1388.

425

- 426 [18] E. Bratland, A.S.B. Wolff, J. Haavik, O. Kämpe, F. Sköldberg, J. Perheentupa, G.
427 Bredholt, P.M. Knappskog, E.S. Husebye, Epitope mapping of human aromatic L-amino acid
428 decarboxylase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353 (2007) 692-698.
429
- 430 [19] Y. Sakolvaree, S. Maneewatch, S. Jiemsup, B. Klavysing, P. Tongtawe, P. Srimanote, P.
431 Saengjaruk, S. Banven, P. Tapchaisri, M. Chonsa-nguan, W. Chaicumpa, Proteome and
432 immunome of pathogenic *Leptospira* spp. revealed by 2DE and 2DE-immunoblotting with
433 immune serum, *Asian. Pac. J. Allergy. Immunol.* 25 (2007) 53-73.
434
- 435 [20] D. Bellido, P.O. Craig, M.V. Mozgovoij, D.D. Gonzales, A. Wigdorovitz, F.A.
436 Goldbaum, M.J. Dus Santos, *Brucella* spp. lumazine synthase as a bovine rotavirus antigen
437 delivery system, *Vaccine* 27 (2009) 136-145.
438
- 439 [21] A. Pitarch, J. Abian, M. Carrascal, M. Sánchez, C. Nombela, C. Gil, Proteomics-based
440 identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in
441 patients with underlying hematological malignancies, *Proteomics* 4 (2004) 3084-106.
442
- 443 [22] E. Morgunova, W. Meining, B. Illarionov, I. Haase, G. Jin, A. Bacher, M. Cushman, M.
444 Fischer, R. Landenstein, Crystal structure of lumazine synthase from *Mycobacterium*
445 *tuberculosis* as a target for drug design: binding mode of a new class of purinetrione
446 inhibitors, *Biochemistry* 44 (2005) 2746-2758.
447
- 448 [23] P.C. Baldi, M.M. Wanke, M.E. Loza, N. Monachesi, C.A. Fossati, Diagnosis of canine
449 brucellosis by detection of IgG antibodies against an 18 kDa cytoplasmic protein of *Brucella*
450 *spp.*, *Vet. Microbiol.* 57 (1997) 273–281.

451

452 [24] C.J. Barelle, C.J. Priest, D.M. Mac-Calum, N.A. Gow, F.C. Odds, A.J. Brown, Niche-
453 specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen, *Cell. Microbiol.* 8
454 (2006) 961-971.

455

456 [25] B. Enjalbert, D.M. Mac-Calum, F.C. Odds, A.J. Brown, Niche-specific activation of the
457 oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*, *Infect. Immun.* 745
458 (2007) 2143-2151.

459

460 [26] A.M. Prentice, H. Ghattas, S.E. Cox, Host-pathogen interactions: can micronutrients tip
461 the balance?, *J. Nutr.* 137 (2007) 1334-1337.

462

463 [[27]S.R. Waterman, M. Hacham, G.X. Hu, Y.D. Park, S. Shin, J. Panepinto, T. Valyi-Nagy,
464 C. Beam, S. Husain, N. Singh, P.R. Williamson, Role of CUF1/CTR4 copper regulatory axis
465 in the virulence of *Cryptococcus neoformans*, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 794-802.

466

467 [28] B.L. Gomez, J.D. Nosanchuk, S. Diez, S. Youngchim, P. Aisen, L.E. Cano, A. Restrepo,
468 A. Casadevall, A.J. Hamilton, Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal
469 pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection, *Infect. Immun.* 69
470 (2001) 5760–5767.

471

472 [29] M.B. Silva, A.F. Marques, J.D. Nosanchuk, A. Casadevall, L.R. Travassos, C.P.
473 Taborda, Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on
474 phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility, *Microbes Infect.* 8 (2006) 197–
475 205.

476

477 **Figure legends:**

478

479 **Figure 1 –Reactivity of the recombinant *PbDDC* and *PbLS* and of the synthetic peptide**
480 **of *PbCTR3* with sera of PCM patients.** The nucleotide sequences of the *Pbddc*
481 oligonucleotide primers were sense 5'-GGATCCATGGACCAGGAAGAATTCAG-3' and
482 antisense 5'-CTCGAGCTAGTTTTTCACAGCCCTGC-3', which contained engineered
483 *Bam*HI and *Xho*I restriction sites (underlined), respectively. The oligonucleotide primers for
484 *Pbbs* were sense 5'- TGGTGAATTCCATGGCTACTCTCAAAGG-3', and antisense 5'-
485 GGTGGTCTCGAGCTACGAAACTTCCCCATTG-3', which contained engineered *Eco*RI
486 and *Xho*I restriction sites (underlined), respectively. The PCR products were digested with
487 the cited restriction enzymes, electrophoresed on agarose gel cloned into pGEX-4T-3, and
488 used to transform *E. coli* cells. (A) SDS – PAGE analysis of *P. brasiliensis* recombinant
489 DDC. The *E. coli* cells harboring the pGEX-4T-3-*ddc* plasmid were grown to an A_{600} of 0.6
490 and harvested before (lane1), and after 16 h (lane 2) incubation with 0.5 mM IPTG at 15 °C;
491 the affinity-isolated recombinant *PbDDC* after thrombin addition and protein purification by
492 affinity chromatography (lane 3). (B) Induced bacterial cells of *E. coli* harboring the pGEX-
493 4T-3-*ls* plasmid were grown at 15°C to an A_{600} of 0.6 and harvested before (lane 1) and after
494 16 h incubation with IPTG, at 15 °C (lane 2). The purified recombinant protein was obtained
495 after thrombin digestion and affinity chromatography (lane 3). (C and D) Immunoblot
496 analyses of the recombinant proteins. The recombinant *PbDDC* and *PbLS* (1.0 µg) were
497 reacted with sera of five PCM patients (1:1,000 diluted), (lanes 1-5) and to control sera
498 (1:1,000 diluted), (lanes 6-10). E- Reactivity of the synthetic peptide from *PbCTR3* with the
499 same sera as in C and D. A peptide was synthesized from amino acids 90 to 130 in the
500 deduced *PbCTR3* (Invitrogen, life technologies). One hundred ng of the synthetic peptide
501 was blotted onto nitrocellulose membrane and reacted with sera from PCM patients and with

502 control sera. After reaction with anti-human IgG alkaline phosphatase coupled antibody
 503 (1:2,000 diluted) the reaction was developed with BCIP/NBT. Molecular mass of the proteins
 504 and standards (kDa) are indicated.

505 **Figure 2 – Average of gene expression of *Pbddc* , *Pbls* and *Pbctr3* as determined by**
 506 **quantitative real time RT-PCR.** (A) qRT-PCR plot of *Pbddc*, *Pbls* and *Pbctr3* expression
 507 levels in mycelium, yeast cells and in a macrophage model of infection. (B)- qRT-PCR plot
 508 of *Pbddc*, *Pbls* and *Pbctr3* expression in yeast cells derived from infected tissues of mice.
 509 The primers were as following: *Pbddc*, sense 5'- GTACCTTCGTCCTCTTCTTC-3',
 510 antisense 5'- GGGTAAGTCACACAAGAGGG-3'; *Pbls*, sense, 5'-
 511 GCCTATTGCTATGGAGAGAATA-3', antisense, 5'- GTTGACGGTGTGAATGAGG-3';
 512 *Pbctr3* sense, 5'- ATGTGAAGC AGCGAGCGG-3', antisense 5'-
 513 CATGGAATGCACGGCGGC -3' *Pbl34*, sense, 5'- CGGCAACCTCAGATACCTTC-3',
 514 antisense 5'- GGAGACCTGGGAGTATTAC -3'. The values of expression of the *Pbddc*,
 515 *Pbls* and *Pbctr3* were standardized using the values of expression of the constitutive gene
 516 encoding to the ribosomal protein L34. The expression level was calculated by relative
 517 standard curve method. The standard deviations are presented from three independent
 518 experiments. *Significantly increased expression ($P \leq 0.05$).

519

520 **Figure 3 - Analysis of melanization of *P. brasiliensis* yeast cells.** A – Light microscopy
 521 (400 X magnification) of *P. brasiliensis* yeast cells grown in chemically defined liquid
 522 medium (1) or the same medium supplemented with L-Dopa (2). B – Dot-blot analysis of
 523 cellular extracts of *P. brasiliensis* grown in same conditions and reacted with antibody anti-
 524 melanin of *S. schenckii* (B) or (C) anti-*PbDDC*. The antibody to the antigen triosephosphate
 525 isomerase (*PbTPI*), was used as the loading control. The analysis of relative differences were
 526 performed by using the Scion Image Beta 4,03 program. In the graphics, the black bars

527 represent the reaction to the antibody anti-*Pb*TPI and the gray bars represent the reaction with
528 the antibodies anti-melanin or anti-*Pb*DDC. The standard deviations are presented from three
529 independent experiments.

530

531 **Supplementary 1 - Alignment of sequences of *Pb*DDC from several fungi.** Amino acid
532 sequences alignment of *Pb*DDC with homologous proteins of pathogenic fungi. The asterisks
533 indicate conserved amino acid residues. Double and single dots denote a decreasing order of
534 matching similarity between each corresponding amino acid pair. The putative pyridoxal
535 dependent decarboxylase conserved domain is black box. Amino acids in gray box represent
536 the putative tyrosine kinase phosphorylation site. Sequence alignment was performed with
537 CLUSTAL X. The aligned sequences were as following: *Paracoccidioides brasiliensis*
538 (GeneBank accession number ABH03461), *Ajellomyces capsulatus* (GeneBank accession
539 number XP_001537267), *Coccidioides immitis* (GeneBank accession number
540 XP_001241290), *Aspergillus fumigatus* (GeneBank accession number XP_748547) and
541 *Cryptococcus neoformans* (GeneBank accession number XP_775806).

542

543

544 **Supplementary 2 - Alignment of sequences of *Pb*LS from several fungi.** Amino acid
545 sequence alignment of *Pb*LS with homologues. Amino acid residues putatively involved in
546 formation of the active site are shown in black box. The putative residues involved in the
547 catalytic activity are shown by arrows. Sequence alignment was performed with CLUSTAL
548 X. The aligned sequences were as following: *Paracoccidioides brasiliensis* (GeneBank
549 accession number DQ081183), *Cryptococcus neoformans* (GeneBank accession number
550 XP_571357), *Coccidioides immitis* (GeneBank accession number XP_001243363),
551 *Aspergillus fumigatus* (GeneBank accession number XP_750526), *Chaetomium globosum*

552 (GeneBank accession number XP_001229248), *Candida albicans* (GeneBank accession
553 number 2JFBA), *Candida glabrata* (GeneBank accession number XP_445031).

554

555 **Supplementary 3 - Alignment of sequences of *PbCTR3* from several fungi.** Amino acid

556 sequence alignment of *PbCTR3* with homologues. The rectangle indicates the amino acid

557 sequence for which the peptide was synthesized. The aligned sequences were as following:

558 *Paracoccidioides brasiliensis* (GeneBank accession number DQ534496), *Ajellomyces*

559 *capsulatus* (GeneBank accession number ABF22674), *Coccidioides immitis* (GeneBank

560 accession number XP001240196) and *Aspergillus clavatus* (GeneBank accession number

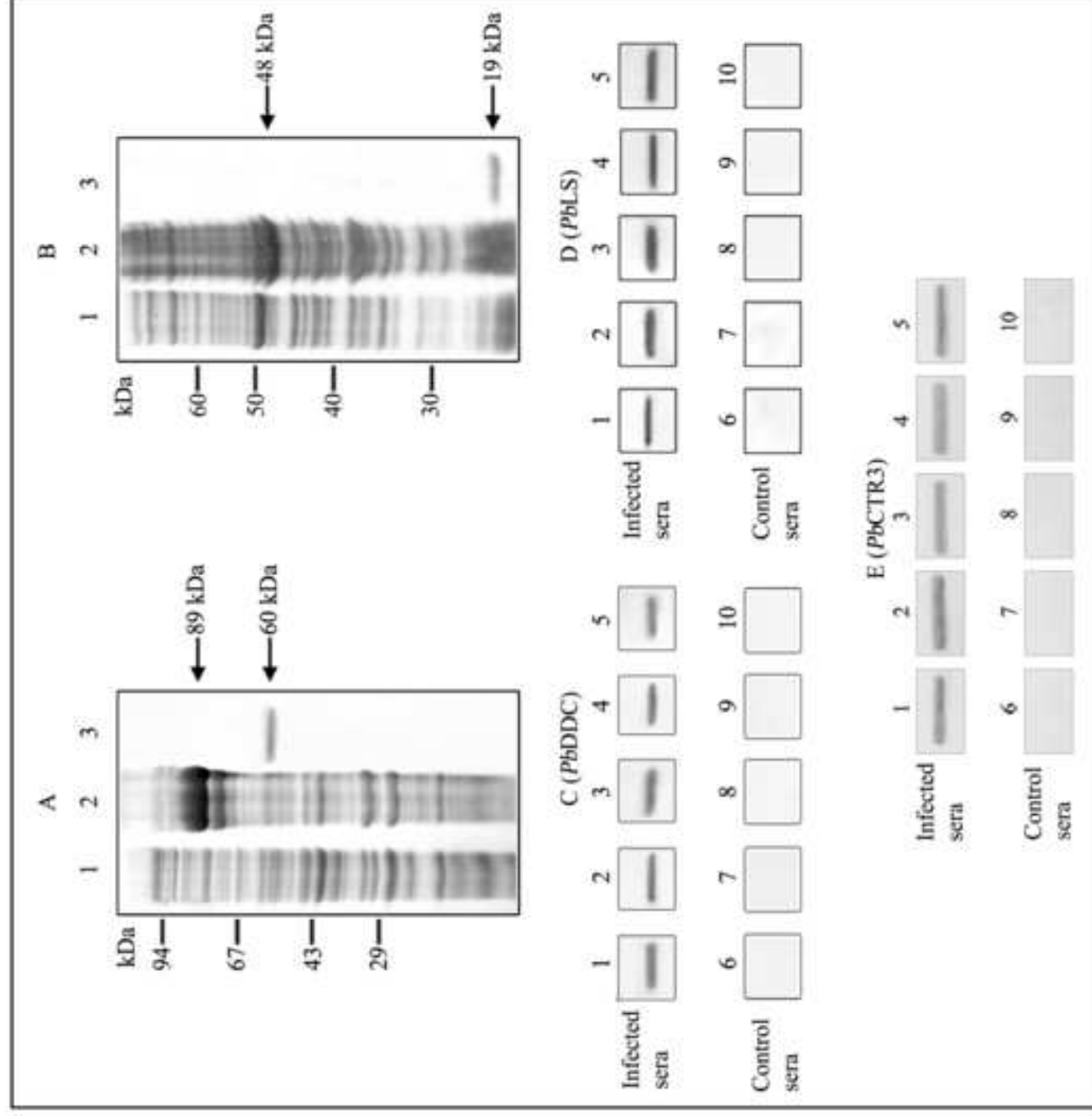
561 XP001272812).

Table1 – Predicted proteins of *P. brasiliensis* encoded by the cDNAs identified by IVIAT

Functional Category	Gene Product-description, function (reference)	Best Hit/GenBank accession number* or <i>P. brasiliensis</i> genome locus†	e-value	E.C. number	Number of positive cDNAs obtained through IVIAT
Metabolism	Acyl-CoA dehydrogenase	<i>P. brasiliensis</i> /CA581965*	5e-101	1.3.1.8	1
	Aromatic-L-amino acid decarboxylase	<i>P. brasiliensis</i> Pb01/PAAG_01563.1†	0.0	4.1.1.28	1
	Ubiquinone (COQ9)	<i>P. brasiliensis</i> Pb01/PAAG_05083.1†	1e-25	—	1
	Lumazine synthase	<i>P. brasiliensis</i> /DQ081183*	4e-78	2.5.1.9	1
	alfa-1,2-galactosyl transferase	<i>P. brasiliensis</i> Pb01/PAAG_02629.1†	1e-8	2.4.1.	1
	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	<i>P. brasiliensis</i> Pb01/PAAG_01677.1†	6e-19	1.-	1
Biogenesis of cellular components	Lipopolysaccharide biosynthesis protein	<i>Trichophyton rubrum</i> /DW709722*	3e-33	—	1
	Cofilin	<i>P. brasiliensis</i> Pb03/PABG_07299.1†	8e-32	—	1
Transport	Coatmer zeta subunit	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> /AA21186.1*	1e-67	—	1
	High affinity copper transporter	<i>P. brasiliensis</i> /ABF93409.1*	2e-59	—	1
	Outer membrane ferric siderophore receptor	<i>Phakopsora pachyrhizi</i> /DN739539*	1e-63	—	1
	Carboxylate/amino acid/amine transporter	<i>Trichophyton rubrum</i> /DW701041*	1e-29	—	1
	ABC transporter	<i>P. brasiliensis</i> Pb03/PABG_07206.1†	1e-7	—	3

Energy	ATP synthase F0 F1 subunit 9	<i>P. brasiliensis</i> /YP_537116.1*	7e-15	3.6.3.14	1
	Alcohol dehydrogenase	<i>P. brasiliensis</i> Pb01/PAAG_02965.1†	2e-9	1.1.1.1	1
	Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit VIIa	<i>P. brasiliensis</i> /ABU46290.1*	1e-86	1.9.3.1	1
Transcription	C2H2 finger domain protein	<i>P. brasiliensis</i> Pb01/PAAG_04481.1†	0.0	—	1
	Nitrogen regulation protein	<i>P. brasiliensis</i> /EH041264.1*	5e-52	—	2
Protein fate	Ubiquitin	<i>P. brasiliensis</i> Pb01/PAAG_06536.1†	3e-29	—	1
	Midasin	<i>P. brasiliensis</i> Pb01/PAAG_00114.1†	0.0	—	3
Signal Transduction	Protein kinase domain	<i>P. brasiliensis</i> Pb01/PAAG_00114.1†	0.0	2.7.1.37	1
	WD repeat protein	<i>P. brasiliensis</i> Pb01/PAAG_02429.1†	0.0	—	2
	Diguanylate cyclase	<i>Trichophyton rubrum</i> /DW692821*	3e-15	4.6.1.-	1
Unclassified	Conserved hypothetical protein	<i>P. brasiliensis</i> /YP_537116*	5e-15	—	1
	Conserved hypothetical protein	<i>P. brasiliensis</i> /CN244805*	1e-23	—	1
	Conserved hypothetical protein	<i>P. brasiliensis</i> Pb01/PAAG_08269.1†	4e-24	—	1
	Conserved hypothetical protein	<i>Ajellomyces capsulatus</i> /XP_001537205.1*	2e-12	—	1
	Hypothetical protein	No hits found	—	—	1
	Hypothetical protein	<i>Neurospora crassa</i> /XP_001728522.1*	1e-10	—	1
Total					35

Figure1
[Click here to download high resolution image](#)



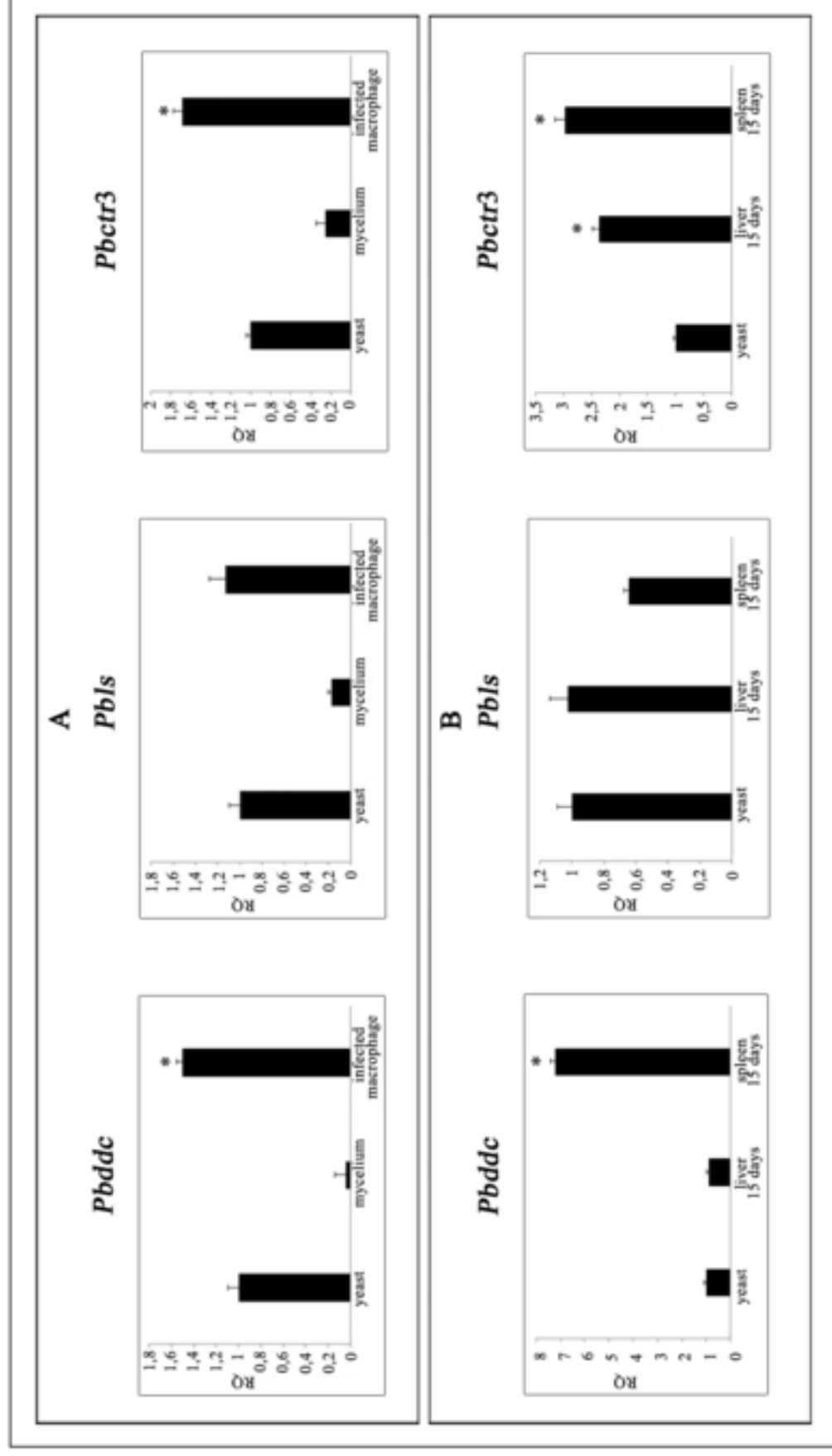
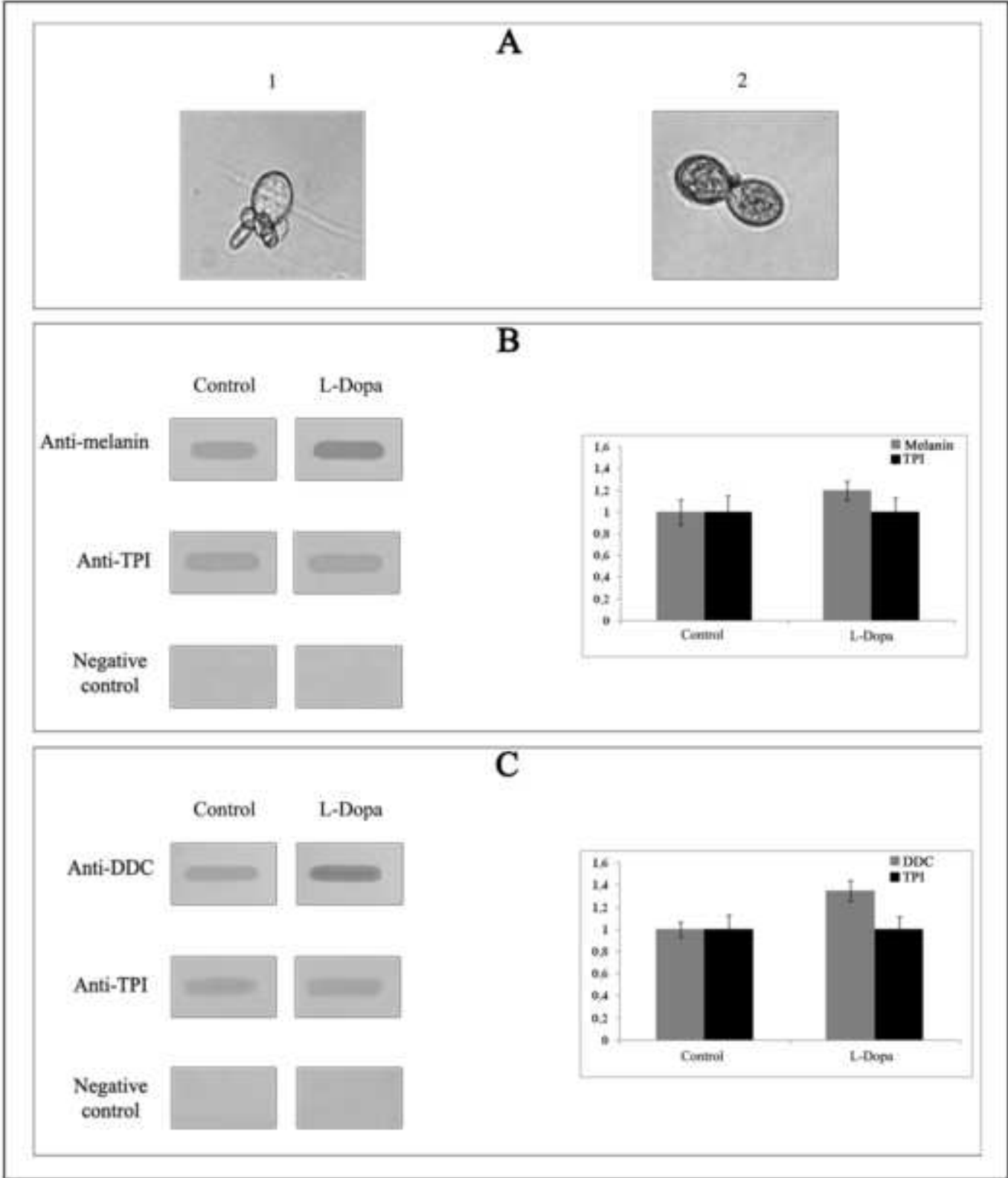


Figure3
[Click here to download high resolution image](#)



X.4.2 – TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS (NACIONAL E INTERNACIONAL).

Trabalhos como primeiro autor:

Santos RS; Bailão AM; Borges CI; Salem-Izacc SM; Dantas SFIM; Deepe GS Jr.; **Soares CMA**. The high affinity copper transporter of *Paracoccidioides brasiliensis* is up-regulated during macrophage infection. Proceedings of the X International Congress on Paracoccidioidomycosis. A Centennial Celebration (Genomic / Proteomic / Cellular Biology / Molecular Biology), Revista Biomédica Instituto Nacional de Salud, Volumen 28, Suplemento No. 1, Bogotá, D.C., Colombia - Agosto, 2008, ISSN 0120-4157.

Santos, RS; Bailão, AM; Deepe Jr., GS ; Soares, CMA. The high affinity copper transporter of *Paracoccidioides brasiliensis* is induced during infection process. Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética, ISBN 978-85-89109-06-2, Pág. 18 Salvador – BA, 2008.

Santos, RS; Bailão, AM; Deepe Jr., GS ; Soares, CMA. Copper and iron limiting conditions induce the expression of the high affinity copper transporter of *Paracoccidioides brasiliensis*. Anais do 26ª Reunião de Genética de Microrganismos, pág 64, Salvador-BA, 2008.

Santos, R. S.; Bailao, A. M. ; Deepe JR, G. S. ; Soares, C. M. A. . Copper Uptake in *Paracoccidioides brasiliensis* Yeast Cells is Increased During Macrophage Infection. In: V Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão (Conpeex) da Universidade Federal de Goiás., 2008, Goiânia - GO. Anais (Resumos Expandidos) da Pós-Graduação - Conpeex - CD-ROM. Goiânia - GO : Editora UFG, 2008. v. 05. p. 01-08.

Trabalhos como co-autor:

Tomazett, MV; Dantas, SFIM; **Santos, RS**; Soares, CMA. The carbonic anhydrase of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, cDNA cloning and characterization. Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética, ISBN 978-85-89109-06-2, Pág. 20 Salvador – BA, 2008.

Tomazett, MV; Dantas, SFIM; **Santos, RS**; Soares, CMA. The carbonic anhydrase of *Paracoccidioides brasiliensis* is induced during infection process. Anais do 26ª Reunião de Genética de Microrganismos, pág 102, Salvador-BA, 2008.

Tomazett, M. V. ; Dantas, S. F. I. M. ; **Santos, R. S.** ; Soares, C. M. A. . The Carbonic Anhydrase of *Paracoccidioides brasiliensis*: Molecular Cloning and Heterologous Expression. In: V Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão (Conpeex) da Universidade Federal de Goiás., 2008, Goiânia - GO. Anais (Resumos Expandidos) da Iniciação Científica PIBIC - Conpeex - CD-ROM. Goiânia - GO : Editora UFG, 2008. v. 05. p. 01-05.

Barbosa, M. S. ; **Santos, R. S.** ; Bao, S. N. ; Andreotti, P. F. ; Feitosa, L. S. ; Mendes-Giannini, M. J. ; Soares, C. M. A. . The Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Performs a Crucial Role in the *Paracoccidioides brasiliensis* Attachment to the Extracellular Matrix Components. In: 26ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador - Bahia. Anais (Trabalhos Completos) da 26ª Reunião de Genética de Microrganismos. São Paulo - SP : Editora SBG (Sociedade Brasileira de Genética), 2008. v. 26. p. 106-106.

X.4.3 – PRÊMIO COMUNICAÇÃO ORAL (2008) – SOCIEDADE BRASILEIRA DE GENÉTICA – MELHOR TRABALHO APRESENTADO NA ÁREA DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS.

1º Lugar (Prêmio Comunicação Oral) - Melhor Trabalho Apresentado na área de Genética de Microrganismos : **The High Affinity Copper Transporter of *P. brasiliensis* is Induced During Infection Process**, Sociedade Brasileira de Genética e Eppendorf do Brasil - 54º Congresso Brasileiro de Genética.

The high affinity copper transporter of *Paracoccidioides brasiliensis* is induced during infection process

Santos, RS¹; Bailão, AM¹; Deepe Jr., GS²; Soares, CMA¹

¹Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia - Brasil

²Divisão de Doenças Infecciosas, Faculdade de Medicina, Universidade de Cincinnati, Ohio - EUA
rdssantos@gmail.com

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, copper, infection, expression analysis and protein interaction

Paracoccidioides brasiliensis is causative agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a dimorphic fungus alternating between the mycelia form found at room temperature and the yeast phase detected in infection tissues or in cultures at 37°C. The fungus undergoes a complex differentiation *in vivo*. Conidia produced by mycelium phase infect the mammalian host through inhalation into the lungs, where they differentiate into the pathogenic yeast phase. The disease is the result of an intimate relationship between host and pathogen. The success of host tissues colonization is intimately associated to pathogen capacity on uptake essential nutrients from the host milieu. Copper is one of those nutrients and the ability in acquiring this metal is considered a virulence factor. Copper is an important cofactor for a wide range of enzymes involved in many biological processes such as respiration, cell growth, iron uptake and oxidative stress. Transcriptional studies have shown that *ctr3* (high affinity copper transporter) of *P. brasiliensis* is induced in yeast cells recovered from liver of infected mice. In the present study we isolated and characterized the cDNA and gene sequences coding to CTR3 of *P. brasiliensis*. The cDNA showed a 582 bp open reading frame (ORF) encoding a predicted protein with 193 amino acids, predicted molecular mass of 21.5 kDa and of pI 8.6. The genomic sequence presented four exons interrupted by three introns. The transcriptional behavior of the *ctr3* gene was analyzed during exposure of *P. brasiliensis* yeast cells to conditions of depletion of iron, copper and zinc by semi-quantitative RT-PCR. It was shown a significant increase in the transcription level of the *ctr3* gene in the combined absence of the three metals, in absence of copper as well as in absence of iron. Real time RT-PCR was used to analyze the expression of *ctr3* in the two fungal morphological forms of *P. brasiliensis* and in yeast cells infecting macrophages. The *ctr3* expression was upregulated in the yeast phase and in yeast cells residing into macrophage phagosomes. Taken all together those data suggest the importance of *ctr3* and of the copper/iron uptake system during the infectious process. In order to better understand the biological function of this molecule, proteic interactions of CTR3 has been done using a *Saccharomyces cerevisiae* two hybrid system. Proteins related with zinc/iron transporter, metal-dependent hydrolase and proteins of a family of sodium/calcium exchanger integral membrane proteins were found to interact with CTR3. The confirmations of those interactions are under progress.

Financial support: MCT/CNPq, CAPES, FINEP and FAPEG.