



FACULDADE UNIÃO DE GOYAZES
CURSO DE FARMÁCIA

**PURIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COBRE-
PROTEÍNAS DE *Paracoccidioides* spp. POR IMAC-MS**

Geovana Santana Rodrigues

Orientadora: Prof. Esp. Aline Brito de Souza

TRINDADE - GO

2015

FACULDADE UNIÃO DE GOYAZES

CURSO DE FARMÁCIA

**PURIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COBRE-
PROTEÍNAS DE *Paracoccidioides* spp. POR IMAC-MS**

Geovana Santana Rodrigues

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade União
de Goyazes como requisito
parcial à obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof. Esp. Aline de Sousa Brito

TRINDADE - GO

2015

Geovana Santana Rodrigues

**PURIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COBRE-
PROTEÍNAS DE *Paracoccidioides* spp. POR IMAC-MS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade União de
Goyazes como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Farmácia aprovada pela seguinte
banca examinadora:

Prof. Esp. Aline de Sousa Brito (Orientadora)

Faculdade União de Goyazes

Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão

Universidade Federal de Goiás

Prof. Ms. Stefani Garcia Rezende

Faculdade União de Goyazes

TRINDADE - GO

14/12/2015

PURIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COBRE- PROTEÍNAS DE *Paracoccidioides* spp. POR IMAC-MS

Geovana Santana Rodrigues¹

Aline de Sousa Brito ²

RESUMO

O gênero *Paracoccidioides* abrange fungos termodimórficos causadores da micose sistêmica paracoccidioidomicose (PCM), que durante o processo infeccioso necessitam obter nutrientes, dentre eles os metais, para a manutenção de processos celulares. Assim, este trabalho objetiva a purificação, identificação e caracterização das proteínas ligantes a Cu das fases leveduriforme e miceliana do *Paracoccidioides* spp. Os resultados das purificações de ambos os isolados apresentaram um perfil proteico semelhante, e demonstram que as proteínas apresentam fortes ligações ao cobre. No total foram obtidas 600 proteínas leveduriformes ligantes a Cu do Pb01. Dentre estas, cerca de 80% apresentaram funções biológicas conhecidas, como endereçamento de proteínas e metabolismo. Sendo a localização citoplasmática a mais evidente, seguida por mitocondrial e nuclear. Diante desses dados, foi possível verificar que o cobre é cofator de proteínas essenciais nos processos biológicos e essas metaloproteínas podem ser novos alvos de terapia.

PALAVRAS-CHAVE: Homeostase de cobre, metaloproteínas e proteoma.

APOIO FINANCEIRO: CNPq, FAPEG e UFG

PURIFICATION, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF COPPER- PROTEIN *Paracoccidioides* spp. IMAC-MS

ABSTRACT

The genus *Paracoccidioides* covers thermomorphous fungi causer of the systemic mycosis paracoccidioidomycosis (PCM), which during the infectious process need to require more nutrients, including metals for the maintenance of cellular processes. Thus, this study aims purification, identification and characterization of proteins binding to Cu of yeast and mycelia phases of *Paracoccidioides* spp. The results of purification of both isolated showed a similar protein profile, and demonstrate that the proteins have strong links to copper. A total of 600 proteins obtained yeast binders to the Cu Pb01. Among

¹ Acadêmica do Curso de Farmácia da Faculdade União de Goyazes.

² Orientadora: Prof. Esp. Aline de Sousa Brito, Faculdade União de Goyazes.

these, approximately 80% had known biological functions, such as addressing protein and metabolism. Since the cytoplasmic location is more evident, followed by mitochondrial and nuclear. Given these data, it found that copper is essential cofactor proteins in biological processes and these metalloproteins can be new targets for therapy.

KEYWORDS: Copper homeostasis, metalloproteins and proteome.

FINANCIAL SUPPORT: CNPq, FAPEG and UFG

¹ Acadêmica do Curso de Farmácia da Faculdade União de Goyazes.

² Orientadora: Prof. Esp. Aline de Sousa Brito, Faculdade União de Goyazes.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
1.1 Aspectos gerais do fungo <i>Paracoccidioides</i> spp.	6
1.2 A doença paracoccidioidomicose (PCM).....	7
1.3 Homeostase de Cu	11
1.4 Metaloproteômica.....	16
 2 METODOLOGIA	
2.1 Cultivo de <i>Paracoccidioides</i> spp.....	19
2.2 Obtenções dos extratos proteicos de <i>Paracoccidioides</i> spp.....	19
2.3 Purificação de metaloproteínas por IMAC.....	20
2.4 Coloração por prata dos géis de poliacrilamida.....	20
2.5 Digestão trípica em solução.....	21
2.6 Identificação de proteínas por LC-MS/MS.....	21
2.7 Caracterização <i>in silico</i> das Cu-proteínas.....	22
 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1 Purificação das Cu-proteínas de <i>Paracoccidioides</i> spp.	23
3.2 Identificação das proteínas ligantes a cobre.....	25
3.3 Caracterização <i>in silico</i> das proteínas ligantes de cobre.....	26
 4 CONCLUSÕES.....	30
 5 REFERÊNCIAS.....	31

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais do fungo *Paracoccidioides* spp.

O gênero *Paracoccidioides* abrange fungos patogênicos que causam a paracoccidioidomicose (PCM), sendo estes pertencentes ao filo Ascomycota, classe Euromyceto, ordem Onygenales e família Ajellomycetaceae, a qual inclui também os patógenos *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* e *Coccidioides posadasii* (BAGAGLI et al., 2006; UNTEREINER et al., 2004).

Até o ano de 2006 o gênero *Paracoccidioides* apresentava uma única espécie representante, *P. brasiliensis*. Estudos baseados em dados de polimorfismo genético, realizados com 65 isolados, demonstraram que o gênero *Paracoccidioides* é um complexo de pelo menos 3 espécies filogenéticas distintas: S1 (espécie 1), PS2 (espécie filogenética 2), PS3 (espécie filogenética 3). S1 compreende isolados do Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela. PS2 compreende 5 isolados brasileiros e 1 venezuelano. PS3 compreende isolados somente da Colômbia, sendo considerada evolucionariamente independente (MATUTE et al., 2006).

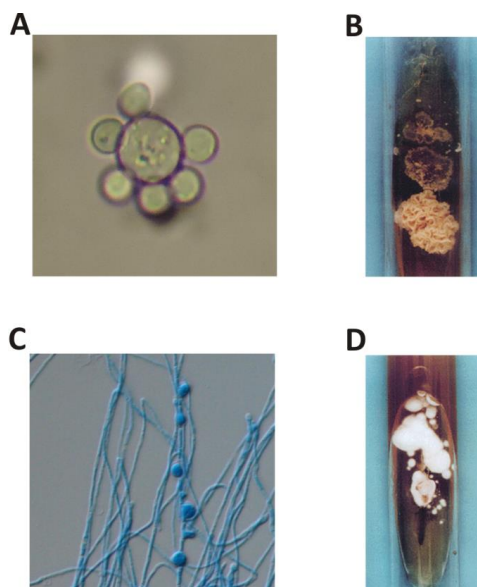
Posteriormente, foram realizados estudos filogenéticos com 21 isolados de *P. brasiliensis*, nos quais estes foram agrupados nos grupos filogenéticos já descritos (S1, PS2 e PS3), com exceção do isolado 01 (*Pb01*), sugerindo assim, a provável existência de uma nova espécie do gênero *Paracoccidioides* (CARRERO et al., 2008), que recentemente foi proposta como *Paracoccidioides lutzii*, em homenagem à Adolpho Lutz, o primeiro pesquisador a observar o fungo em 1908 (TEIXEIRA et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2009).

O *Paracoccidioides* spp. é composto por fungos que apresentam dimorfismo térmico e essa característica é considerada essencial para o mecanismo de virulência e de patogenicidade, uma vez que isolados incapazes de se diferenciar não são virulentos (DE MORAES, SCHAFFER, 2002; ROONEY, KLEIN, 2002).

A forma de levedura cresce *in vitro* a 37°C e em tecidos infectados, apresentam formato oval ou esférico (CARBONELL, 1969; FRANCO et al., 1993), paredes bi-refringentes (dupla) e crescem por brotamento multipolar caracterizando a aparência de roda de leme (CARBONELL, RODRIGUEZ,

1965; MARTINEZ, 2004; BRUMMER et al., 1993). Macroscopicamente os aspectos das colônias são: coloração creme, aspecto cerebriforme e não aderente ao meio. Já na forma miceliana, o fungo é evidente após o cultivo em temperaturas inferiores a 28°C ou em condições saprobióticas. Os aspectos macroscópicos das colônias micelianas são: coloração esbranquiçada, micélios aéreos e irregulares e a característica microscópica é a presença de hifas septadas, figura 1 (LACAZ, 1994; LACAZ et al., 2002; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Mediante falta de nutrientes ou sob estresse, o micélio pode transformar-se em conídios (RESTREPO, 1988).

Figura 1 - Morfologia de *Paracoccidioides* spp.



Fontes: Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás; Lacaz et al., (1999) e Universidade de Chiba, Japão. Características microscópicas: levedura (A) e micélio (C).
Aspecto das colônias a 37 °C (levedura, B) e 25 °C (micélio, D).

Além da temperatura, o fator nutricional também pode influenciar no dimorfismo. Pois, estudos realizados por Villar et al. (1988), mostraram que, mesmo a 25°C, foi possível preservar a expressão fenotípica de leveduras ao adicionar soro fetal de bovino tanto à meio de cultura complexo quanto à meio quimicamente definido.

1.2 A doença paracoccidioidomicose (PCM)

A PCM é uma micose sistêmica causada pela inalação dos conídios e/ou propágulos produzidos pela forma miceliana de *Paracoccidioides* spp. que, ao atingirem o epitélio pulmonar, transformam-se em levedura, a forma parasitária

(MCEWEN et al., 1987). A partir dessa primeira interação parasita-hospedeiro o fungo pode disseminar-se através das vias hematogênica e/ou linfática, chegando a outros órgãos, como, baço, fígado e sistemas (CAMARGO, FRANCO, 2000; VALERA et al., 2008).

Esta doença é uma endemia da América Latina e os países com maior ocorrência são o Brasil, Venezuela e Colômbia (BRUMMER et al., 1993). Cerca de 80% dos casos relatados são provenientes do Brasil e os estados com maior ocorrência são Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso e Amazônia (COUTINHO et al., 2002). Embora a PCM seja geograficamente restrita, já foram identificados casos de PCM em áreas não endêmicas (autóctones), como, na Europa, Estados Unidos da América e na Ásia (AJELLO, POLONELLI, 1985). Isso ocorre devido a existência de um período assintomático da PCM que dura em média 15,3 anos, após o contato do paciente com a área endêmica (BRUMMER et al., 1993).

A PCM é uma doença sem notificação compulsória, portanto, não há dados precisos sobre sua incidência no Brasil. Acredita-se que em áreas endêmicas seja em torno de 3-4 novos casos/1.000.000 de habitantes até 1-3 novos casos/100.000 habitantes ao ano. Dentre os 3583 casos de mortes devidos a micoses sistêmicas, ocorridas na década de 1996 a 2006, a PCM apresentou-se como a micose mais frequentemente mencionada (PRADO et al., 2009). É considerada a oitava causa de morte decorrente de doença infecciosa e possui uma taxa de mortalidade de 1,45 casos/1.000.000 de habitantes (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Até a puberdade a incidência da PCM é a mesma em ambos os sexos, porém, na fase adulta há uma discrepância, pois, 80% dos pacientes são do sexo masculino (SANO et al., 1999). Um fator predisponente para aquisição da PCM é o trabalho com o solo em áreas rurais (FRANCO, 1987). Além disso, evidências sugerem um fator hormonal protetivo em mulheres. O hormônio 17- β -estradiol interage com a proteína citoplasmática EBP (*Estradiol Binding Protein*) do fungo, bloqueando a transição da forma infectante miceliana para a patogênica leveduriforme de *Paracoccidioides* spp. (RESTREPO, 1985; SANO et al., 1999; SHANKAR et al., 2011). Entretanto, o fator comportamental deve

ser considerado, pois, mulheres são menos expostas a solos contaminados (SHIKANAI-YASSUDA et al., 2006).

Adicionalmente, estudos realizados por Pinzan e colaboradores (2010) demonstraram que camundongos machos e fêmeas apresentam padrões de resposta imunológica diferentes. Observou-se uma maior produção das citocinas, interleucina-12 (IL-12), interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) por células de baço de camundongos fêmeas estimuladas com antígeno paracoccina. Já em células de camundongos machos apresentaram maior produção de interleucina-10 (IL-10), sugerindo respostas imunológicas diferentes entre os sexos. Estas diferenças indicaram que camundongos fêmeas apresentam uma resposta imunológica mais protetiva que os machos, fato que poderia contribuir para a maior incidência da PCM em homens.

Essa micose sistêmica é dividida em duas formas clínicas: infecção (forma subclínica) e doença. A primeira é assintomática e inclui indivíduos com lesões residuais inativas que contenham *Paracoccidioides* spp. Já a doença sintomática é subdividida em: aguda/subaguda ou crônica. A forma aguda (figura 2) ou subaguda (juvenil) caracterizada pela incubação do fungo de semanas a meses é a mais severa e propaga-se com rapidez pelo sistema retículo-endotelial (baço, fígado, linfonodos e medula óssea) provocando lesões múltiplas (multifocal) com ocorrência similar em ambos os sexos, acometendo, principalmente crianças e jovens (FRANCO et al., 1987; RESTREPO-MORENO, 1993; BRUMMER et al., 1993).

Figura 2 - Crianças manifestando a forma aguda/subaguda da paracoccidioidomicose.



Fonte: SHIKANAI-YASUDA, et al., 2006. (A) abscessos em regiões frontal e claviclar, decorrentes do acometimento ósteo-clavicular. (B) acometimento linfático abscedado. (C) linfadenomegalia inguinal. (D) acometimento linfático abdominal com ascite e hepato-esplenomegalia.

A forma crônica (adulto) representa aproximadamente 90% dos casos, com curso lento (meses a anos) geralmente em pacientes do sexo masculino superiores a 30 anos de idade, figura 3. Esta forma afeta primeiramente os pulmões (unifocal) com uma significativa morbidade, podendo disseminar para outros órgãos e tecidos (multifocal) (FRANCO et al., 1987; LONDERO; RAMOS, 1990). Sendo as manifestações clínicas e o prognóstico desta micose dependentes de um equilíbrio entre fatores do hospedeiro e do fungo (BRUMMER et al., 1993).

Figura 3 - Manifestações clínicas da forma crônica da paracoccidioidomicose.



Fonte: SHIKANAI-YASUDA, et al., 2006. (A) Face com lesões cutâneas decorrentes da disseminação hematogênica. Lesões papulosas e úlcero-crostosas. (B) Acometimento peri-oral e mentoniano. (C) Linfonodos cervicais e submandibulares fistulizados. (D) Lesão apresentando bordas irregulares na região peri-anal.

1.3 Homeostase de Cu

Durante o processo infeccioso, os micro-organismos patogênicos, necessitam de uma variedade de elementos advindos do hospedeiro para o suprimento das suas necessidades e persistirem no organismo (BROCK, 2009). Dentre estes, estão os micronutrientes metálicos, essenciais e fundamentais em vários processos celulares, tais como, os metais de transição ferro (Fe), cobre (Cu) e zinco (Zn) (ANDREINI *et al.*, 2008). Outros íons, como, molibdênio, chumbo e selênio, também vêm sendo identificados como funcionalmente ativos nos sistemas biológicos (SHI, CHANCE, 2008; YANNONE *et al.*, 2012). Porém, estes podem ser tóxicos, se os níveis de captação e distribuição não estiverem controlados, pois, em excesso podem gerar radicais livres que comprometem as funções celulares (PEÑA *et al.*, 2000; THEIL, EISENSTEIN, 2000; EIDE, 2003). Como o cobre que possui propriedade redox, portanto, apresenta capacidade de receber e doar elétrons por meio da reação de *Fenton*, que gera radicais livres, que são capazes de reagir com várias macromoléculas, podendo causar dano a lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (HODGKINSON, PETRIS, 2012).

O cobre é um metal de transição que é capaz de transitar entre dois estados redox, Cu^{+2} (oxidado) e Cu^{+1} (reduzido). Esse íon atua como cofator de

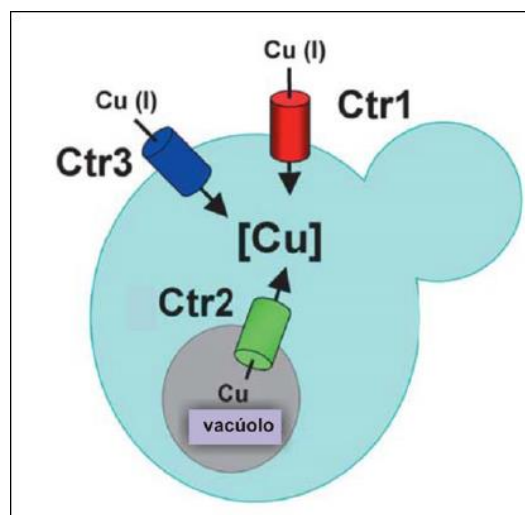
diversas enzimas envolvidas em processos biológicos como: respiração, crescimento celular, aquisição de ferro, proteção contra estresse oxidativo, pigmentação (melanização) entre outros (PUIG et al., 2002). As superóxido dismutases (SOD), enzimas cobre-dependentes neutralizam os radicais livres que causariam danos celulares (WOOD, THIELE, 2008). Outras enzimas cobre-dependentes são as lacases (multicobre oxidases) atuantes na via de biossíntese de melanina em fungos (ALSPAUGH et al., 1997; WALTON et al., 2005).

Como uma quantidade suficiente de metais é necessária para o metabolismo, tanto do hospedeiro como do patógeno, esses apresentam recursos para manter a homeostase desses íons metálicos (SCHAIBLE, KAUFMANN, 2004). Apesar dos tecidos vivos restringirem a disponibilidade de cobre, ferro e zinco para suprimir o crescimento de patógenos (PAPANIKOLAOU, PANTOPOULOS, 2005), estes apresentam estratégias suficientes para a aquisição desses metais, mesmo mediante condições de disponibilidade limitada (WEINBERG, 2009). Portanto, o conhecimento desses mecanismos de obtenção e manutenção da homeostase representa aspectos cruciais na compreensão dos mecanismos de virulência do patógeno (YASMIN et al., 2009). Diversos mecanismos homeostáticos foram identificados, dentre estes estão a regulação da expressão de genes envolvidos na aquisição, distribuição e armazenamento desses metais (RUTHERFORD, BIRD, 2004), garantindo níveis fisiológicos e impedindo o acúmulo em níveis citotóxicos (BEAUDOIN, LABBÉ, 2006).

O organismo modelo eucariótico que vem sendo utilizado para os estudos dos mecanismos de transporte dos micronutrientes é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Estes estudos demonstram que essa captação de metais é mediada por dois sistemas de transportes específicos, sendo que o cobre encontrado no meio extracelular na forma Cu^{+2} é reduzido a Cu^{+1} pelas metaloredutases (Fre1 e Fre2) presentes na membrana plasmática (GEORGASTOU et al., 1997). Assim, as proteínas transportadoras de cobre (CTR's) realizam o transporte desse íon através da membrana (DANCIS et al., 1994; BEAUDOIN, LABBÉ, 2006). O sistema de alta afinidade é composto por duas permeases, Ctr1 e Ctr3 proteínas que localizam-se na membrana

plasmática de *S. cerevisiae* realizando o papel de captação extracelular de cobre. Enquanto que a Ctr2 transporta e armazena o íon em vacúolos apresentando importância nos processos de detoxificação celular e libera o íon nos períodos de carência para as proteínas cobre-dependentes, como ilustrado na Figura 4 (PETRIS, 2004). Duas outras permeases fazem parte do sistema de baixa afinidade de *S. cerevisiae*, são elas Fet4 e Smf (KIM, NEVITT, THIELE 1988). Após a transferência para o meio intracelular, o cobre é transportado para a mitocôndria, compartimentos secretórios ou para enzimas citosólicas, por meio de chaperonas específicas de cobre, como, a Atx1 e o transportador de cobre do aparato de Golgi (Ccc2) (ARNESANO et al., 2001; SCHMIDT, RAMOS-GOMEZ, CULOTTA, 1999).

Figura 4 - Modelo representando a localização celular das proteínas transportadoras de cobre de alta afinidade (CTR's) proposto para *S. cerevisiae*.



Adaptação: Petris, 2004. CTR1 e CTR3 são transportadores localizados na membrana plasmática, responsáveis pela captação de íons cobre no meio extracelular. CTR2 é o transportador localizado no citosol e na membrana de vacúolos, que exercem as funções de armazenar cobre em excesso nos compartimentos vacuolares e fornecer o mesmo quando seus níveis encontram-se limitantes.

Em *S. cerevisiae* a regulação transcricional da homeostase de cobre está bem detalhada, sendo que foram identificados dois fatores de transcrição responsivos ao cobre. O fator Ace1 tem por finalidade ativar a expressão gênica em condições de elevados níveis de cobre; enquanto o fator Mac1, ativa a expressão na deficiência desse metal (RUTHERFORD, BIRD, 2004). Ace1 atua por meio da ativação da expressão dos genes codificadores das metalotioneínas e da SOD, para proteção da célula contra a toxicidade do

metal (THIELE, 1988). Já Mac1 ativa a expressão dos genes atuantes na absorção de cobre, CTR1 e CTR3, e da redutase FRE1 (LABBE, ZHU, THIELE, 1997).

Outro mecanismo utilizado para o controle da homeostase de metais é o processo de autofagia (ONDERA, OHSUMI, 2005). Estudos realizados em *Aspergillus fumigatus*, demonstraram que este ao ser cultivado na ausência de metais, apresentava deficiência no crescimento, condição essa em que o fungo realizava processos autofágicos, fazendo assim, a reciclagem de proteínas associadas a íons metálicos pré-existentes. Desse modo, há a liberação dos metais, podendo estes serem utilizados nos processos metabólicos do fungo e no restabelecimento da homeostase. Pois, ao realizar esses experimentos acrescentando os metais, zinco, ferro e cobre, nos meios de cultura escassos em micronutrientes, foi possível observar que o crescimento do micro-organismo foi restabelecido (RICHIE, ASKEW, 2008).

Pouco se sabe sobre o metabolismo de cobre em *Paracoccidioides*. De acordo com as análises *in silico* realizadas por Silva et al. (2011) comparando os dados genômicos de *Paracoccidioides* spp. e *Cryptococcus* spp. revelou genes que estão relacionados com a redução de cobre por metaloredutases, *fre*. Foi analisado que homólogos do gene do fator de transcrição de cobre (*mac1*) estão presentes nos genomas de Pb01 e Pb03, mas não no Pb18. Porém, CTR3 foi encontrado nos três genomas. Homólogos de CTR2 foram encontrados nos Pb03 e Pb18, mas não no Pb01. Além disso, não foram encontrados genes para CTR1.

Em *Cryptococcus neoformans* o processo de homeostase de cobre ocorre pela atuação de dois transportadores de alta afinidade, Ctr1 e Ctr4, que são localizados na membrana plasmática e são fundamentais para a aquisição de cobre mediante condições de escassez deste metal (WALTON et al., 2005; ZHU, WILLIAMSON, 2003). Estudos recentes demonstram que o processo de detoxicação de cobre ocorre através das proteínas MTs (Cmt1 e Cmt2), sendo estas essenciais para a sobrevivência do fungo durante a colonização e para a virulência, indicando que *C. neoformans* encontra elevados níveis de Cu no hospedeiro durante o processo infeccioso (DING et al., 2013). A resposta à

alteração dos níveis de cobre em *C. neoformans* é controlada pelo fator de transcrição Cuf1, um ortólogo de Mac1 em *S. cerevisiae*. O gene CUF1 contribui para a virulência, incluindo a formação de melanina (LIN et al., 2006). Entretanto, estudos identificaram uma dependência inesperada de Cuf1 para a expressão de MT em resposta ao excesso de Cu (DING et al., 2011), assim, Cuf1 atua tanto nas vias de absorção quanto nas de desintoxicação de cobre da célula (SAMANOVIC et al., 2012).

O cobre vem sendo descrito por ter a capacidade de atuar de forma positiva ou negativa na virulência de bactérias, fungos e vírus. No *C. neoformans*, esse metal está envolvido na expressão de fatores relacionados à virulência, como a produção de melanina e a síntese da cápsula polissacarídica (WATERMAN et al., 2007). Cobre é conhecido por contribuir para a imunidade do hospedeiro, assim estudos demonstraram que a capacidade de fagócitos de fagocitar *Salmonella enterica* sv *Typhimurium* diminuiu mediante a deficiência de cobre (PERCIVAL, 1998), portanto, os animais que apresentam deficiência de cobre são mais susceptíveis à infecção por *S. enterica* sv. *Typhimurium* (SUTTLE, JONES, 1989). O cobre é essencial para a virulência do fungo *Botrytis cinerea*, pois, experimentos realizados com mutantes defeituosos para a proteína transportadora de cobre (ATPase BcCcc2) resultaram em organismos avirulentos de infecção em folhas de tomate (SAITOH et al., 2010). Portanto, esses estudos demonstram a importância da homeostase de cobre para a patogênese de micro-organismos.

Por apresentar a propriedade tóxica, este metal vem sendo utilizado por seu papel antimicrobiano há milhares de anos. Um dos primeiros relatos do uso de cobre como agente antimicrobiano na área da saúde foi descrito em um texto pelo médico egípcio Edwin Smith, no qual utilizou o Cu para esterilização de água e feridas (DOLLWET, 1985). Desde então o cobre vem sendo utilizado, por exemplo, como fungicida para plantas (BORKOW, GABBAY, 2005). Atualmente as superfícies de contato de ambientes hospitalares são feitas de cobre, de forma a combater a propagação de micro-organismos nesse ambiente. Estudos demonstram que *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina, foram destruídas em superfícies de cobre dentro de 90 minutos, enquanto que em superfícies de aço inox, esse tempo aumentou para 72 horas

(NOYCE et al., 2006). Além disso, estudos relatam que diversas bactérias foram mortas em poucos minutos após o contato com superfícies de cobre (ESPÍRITO SANTO et al., 2011).

Por apresentar essa toxicidade, o hospedeiro estabelece uma resposta inata do sistema imune, que mobiliza cobre para os locais de infecção, de forma a eliminar os patógenos. Assim, há micro-organismos que apresentam mecanismos de escape dessa alta concentração de cobre, como, por exemplo, o patógeno *Mycobacterium tuberculosis* (WOLSCHEENDORF et al., 2011). O mecanismo utilizado por *M. tuberculosis* é o efluxo de cobre durante a infecção de macrófagos, através da regulação de genes que codificam P-type ATPase (WARD et al, 2008; ROWLAN, NIEDERWEIS, 2012). Outros patógenos, como, *Klebsiella pneumoniae* e *Legionella pneumophila* também apresentam genes que conferem resistência ao cobre (SANDEGREN et al., 2012; SHOEB et al., 2012).

Como foi mencionado, certas proteínas para exercerem sua função biológica necessitam de um metal específico, sendo denominadas metaloproteínas, onde o metal ligante participa (NELSON, COX, 2011; DEGTYARENKO, 2000) na estabilização estrutural e/ou catalítica (MOUNICOU, SZPUNAR, LOBINSKI, 2009; GÓMEZ-ARIZ et al., 2004; SZPUNAR, 2005; SHI et al., 2011). Desta maneira as funções biológicas de um metal estão relacionadas com as funções das proteínas metal dependentes. Assim, com a finalidade de descobrir quais são as metaloproteínas e suas funções biológicas, surgiu a metaloproteômica (SUN et al., 2011).

1.4 Metaloproteômica

A metaloproteômica abrange técnicas e conhecimentos com o intuito de identificar as metaloproteínas produzidas por uma célula e, além disso, descobrir as interações e interdependências dos processos biológicos, por isso o interesse na identificação e caracterização destas moléculas é crescente (VERBI et al., 2005). Segundo Andreini et al. (2008) um terço de todas as proteínas tem pelo menos um íon metálico ligado *in vivo*, e quase metade de todas as enzimas requerem um cofator metálico para realização de catálise. Assim, o estudo do metaloproteoma dos sistemas biológicos pode contribuir

para a melhor compreensão da função destes elementos nas células (SUN et al., 2011).

A análise do metaloproteoma é dividida em duas etapas: primeiramente devem-se separar as proteínas a partir do fracionamento de um extrato celular, geralmente utilizam-se técnicas eletroforéticas (VERBI et al., 2005) e/ou cromatográficas (MANLEY et al., 2009) e posteriormente realiza-se a identificação destas moléculas (MOREIRA et al., 2004).

Diversas estratégias experimentais são utilizadas nos estudos metaloproteômicos. A ferramenta de espectrometria de massas por plasma induzido (ICP- MS) é útil nos estudos metalômicos e metaloproteômicos, pois, possui capacidade de identificar diferentes íons metálicos em amostras biológicas, além de quantificar os metais (BETTMER, 2005; SANZ-MEDEL, 2005). A absorção espectroscópica de raios-X em larga escala, fornece uma análise direta de proteínas e proteomas da distribuição de metais em tecidos e células (ARISTIZABAL et al., 2002; LOBINSKI et al., 2006). A bioinformática auxilia na busca de domínios de ligação a metais conservados em sequências protéicas (BERTINI, ROSATO, 2003; ANDREINI et al., 2004).

A cromatografia de afinidade por metais imobilizados (IMAC) acoplada a espectrometria de massas (MS) é uma das estratégias utilizadas para a identificação de proteínas ligantes a metais, além da descrição de novos domínios protéicos de ligação aos elementos inorgânicos (MONTES-BAYON et al., 2003; SHI, CHANCE, 2008; BARNETT et al., 2012; YANNONE et al., 2012). Essa técnica é baseada na diferença de afinidade que íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida apresentam por certos grupamentos expostos em uma superfície de uma molécula em solução (PORATH, 1988). Qualquer metal que possui a capacidade de interação com proteínas pode ser utilizado em IMAC, porém, os mais frequentemente empregados são Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} e Ca^{2+} (SULKOWSKI, 1988). Para cada proteína alvo, há a possibilidade de desenvolver métodos de separação específicos, através da escolha adequada do íon metálico, do agente quelante e de condições cromatográficas (pH, força iônica, tampão, etc) (PORATH, 1988; WONG et al., 1991). Por ser um método de purificação de proteínas que apresenta baixo custo, alta especificidade e capacidade de adsorção esta é muito utilizada. Porém, apresenta algumas desvantagens, como, reações de

oxidação e o desprendimento dos metais durante a cromatografia (HOCHULI, 1988).

As metaloproteínas de alguns micro-organismos já foram descritas, como *Pyrococcus furiosus*, no qual para a identificação dessas proteínas ligantes a metais foram utilizadas a cromatografia líquida de elevado rendimento associada à espectrometria de massas (HT-MS/MS) e ICP- MS. Foram identificados 18 metais associados às proteínas de extrato citoplasmático desse procaríoto, tais como, molibdênio (Mo), manganês (Mn), vanádio (Vn), chumbo (Pb), urânio (U). Sendo ferro (Fe) e zinco (Zn) os metais mais encontrados nas frações proteicas. Essa análise permitiu a identificação de 158 metaloproteínas que apresentam domínios de ligação à metais desconhecidos. Contribuindo assim, para a caracterização de novos domínios protéicos de ligação a íons metálicos e a identificação de novas funções desempenhadas por estes nos organismos vivos (CVETKOVIC et al., 2010). O fracionamento proteico por IMAC-MS permitiu a identificação de proteínas ligantes a cobre e zinco de *Streptococcus pneumoniae*, sendo 232 ligantes a Cu e 166 a Zn, estas em sua maioria, envolvidas no metabolismo de proteínas, nucleotídeos e carboidratos, oxidação de biomoléculas e regulação do ciclo celular (SUN et al., 2011). O metaloproteoma da cianobactéria *Synechococcus* sp. foi obtido pelos métodos de IMAC e ICP-MS, sendo os metais mais abundantes ferro (Fe), níquel (Ni) e cobalto (Co) (BARNETT et al., 2012).

Análises *in silico* de metaloproteínas do complexo *Paracoccidioides* realizadas por Tristão et al. (2015) demonstraram que as proteínas ligantes ao zinco, ferro e cobre, representam em média, 7,6% do proteoma predito destes organismos. Sendo proteínas de zinco as mais abundantes, representando 5,7% do proteoma do fungo, enquanto que as proteínas de cobre e de ferro representam 0,3 e 1,2%, respectivamente. Essas análises mostraram 26 proteínas ligantes ao cobre nos genomas de *P. lutzii* e *Pb03* (isolado 03 de *P. brasiliensis*), e 25 proteínas nos genomas de *Pb18* (isolado 18 de *P. brasiliensis*) que estão envolvidas em sua maioria no transporte de íons e síntese de melanina, pois, foram encontrados 6 transportadores de cobre e 3 laccases. Além destas, encontrou-se proteínas relacionadas ao stress, a superóxido dismutase que é Cu-dependente, três amino oxidase com domínio de cobre, sugerindo o seu papel catalítico e 5 proteínas hipotéticas com

domínios ligantes ao cobre. Sendo a presença dessas proteínas fatores de virulência fúngica.

As proteínas ligantes ao zinco apresentaram aproximadamente 500 proteínas cada genoma e estas são relacionadas principalmente as funções de ciclo celular, transcrição do DNA, processamento de DNA e endereçamento de proteínas, sendo a localização nuclear a mais freqüente. Sugeriram que as proteínas ligantes ao Zn ocorre com maior frequência devido aos seus dois papéis principais: catalítico e estrutural. Já as Fe-proteínas dos genomas de Pb01, Pb03 e Pb18 representaram 115, 111 e 115, respectivamente, sendo a função de metabolismo a mais exercida e a localização mais evidente a citoplasmática (TRISTÃO et al., 2015).

Assim a identificação e caracterização do metaloproteoma do fungo pertencente ao gênero *Paracoccidioides*, tem por finalidade o melhor entendimento das funções desempenhadas por estes metais na patogenicidade desses fungos. Pois, estes são elementos cruciais para a manutenção da homeostase. Além do mais que a adaptação de *Paracoccidioides* spp. a condições de baixa disponibilidade de metais envolve a modulação de metaloproteínas, sendo assim, esses resultados permitirão o melhor conhecimento das metaloproteínas envolvidas na virulência do fungo. O objetivo geral desse trabalho é purificar, identificar e classificar as Cu-proteínas das fases leveduriforme e miceliana de *Paracoccidioides* spp.

2 METODOLOGIA

2.1 Cultivo de *Paracoccidioides* spp.

Para esta pesquisa foram utilizados os isolados de *P. lutzii* - Pb01 (ATCC MYA-826) e *P. brasiliensis* - Pb18. Os extratos protéicos de levedura e micélio foram obtidos através do cultivo do fungo em meio Fava-Netto (FAVA-NETTO, 1955) sólido por 7 dias, a 37°C para a cultura leveduriforme e a forma miceliana a 22°C por 15 dias. Após, as células foram transferidas para o meio Fava-Netto líquido e incubado por 72 horas a 37°C para levedura e 5 dias a 22°C para micélio, sob agitação.

2.2 Obtenções dos extratos proteicos de *Paracoccidioides* spp.

Após o crescimento do fungo em meio Fava-Netto líquido, as células foram centrifugadas (3000 rpm), lavadas com tampão de extração (Tris HCl 15 mM, pH 8,0) duas vezes, ressuspensas com tampão de extração, transferidas para tubos de extração contendo glassbeads que foram lisadas no disruptor de células (Beadbeater, Biospec). Esse lisado foi centrifugado uma vez a 12000 x g por 5 minutos para retirar os restos celulares e o sobrenadante transferido para tubos novos. Após, o extrato protéico foi quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e o perfil qualitativo analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida acrescido de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e corado com Commassie blue.

2.3 Purificação de metaloproteínas por IMAC

Resinas de IMAC foram preparadas para a purificação de proteínas leveduriformes e micelianas ligantes a cobre. Após a lavagem da resina IMAC – select affinity (Sigma Aldrich), as colunas foram carregadas com 50 mM de CuSO₄, durante 15 minutos. Resina não ligada a íons metálicos foi utilizada como controle. A resina foi centrifugada e lavada duas vezes com água ultrapura para remoção dos íons metálicos em excesso não ligados. Em cada coluna foi carregada 3,75 mg de extrato proteico que foram incubadas por 15 minutos para ligação das metaloproteínas. Posteriormente, centrifugou e armazenou o sobrenadante. Em seguida as colunas Cu foram lavadas 2 vezes (500 µL) com tampão de equilíbrio (TE - Tris-HCl, NaCl, pH 8,0) com 2 M de uréia; e eluídas com as seguintes soluções, 2 mM de imidazol, 20 mM de imidazol, 200 mM de imidazol e uma vez com TE adicionado de 50 mM de EDTA (ácido etileno-diamino-tetraacético). Os sobrenadantes das lavagens e as eluições foram concentrados em filtros Amicon Ultra 0.5mL com retenção de 3kDa (Merck Millipore). Após, as diferentes frações foram analisadas por eletroforese (SDS-PAGE) utilizando a coloração por prata (WILSON, WALKER, 2010).

2.4 Coloração por prata dos géis de poliacrilamida

Após a eletroforese, os géis de poliacrilamida foram colocados em uma solução fixadora (metanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v) e formaldeído 0,925mL/L) por 1 hora. Posteriormente, essa solução foi removida e os géis

foram incubados em uma solução de etanol (50% (v/v)) por 10 minutos, sendo essa etapa repetida por 3 vezes. Após o descarte do etanol, foram submergidos em uma solução de tiosulfato (tiosulfato de sódio 0,2g/L) por 1 minuto, logo após, essa solução foi descartada. A seguir, foi realizada a lavagem com água ultra-pura, por 20 segundos, sendo repetida por 3 vezes. Após desprezar a água, os géis foram imersos em uma solução impregnante (nitrato de prata 2g/L e formaldeído 37% 0,75 ml/L) por 20 minutos. Em seguida, realizou-se a lavagem com água ultra-pura, por 20 segundos. Posteriormente, foram submersos na solução reveladora (carbonato de sódio 60g/L, formaldeído 0,5ml/L, tiosulfato de sódio 4mg/L). Após o aparecimento das bandas nos géis, descartou-se a solução reveladora e adicionou-se a solução de paragem (metanol 50% (v/v) e ácido acético 12% (v/v)) (OAKLEY, KIRSCH, MORRIS, 1980).

2.5 Digestão trípica em solução

Às amostras (50 µL), contendo as Cu-proteínas purificadas, adicionou-se 10 µL de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 50mM pH 8,5 e 25 µL de RapiGest SF 0,2% v/v (MURAD et al., 2011), posteriormente foram incubadas por 15 min à 80°C. Em seguida as proteínas foram reduzidas com 2,5 µL de DTT 100mM 30 min à temperatura ambiente ao abrigo da luz 60°C e alquiladas com 2,5 µL de iodoacetamida 300mM incubou-se por 30 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A digestão trípica das amostras foi iniciada adicionando-se 10 µL de uma solução de tripsina (50 ng/µL da enzima em 50mM de bicarbonato de amônio). A digestão foi realizada à 37°C por 16 horas. Após, o RapiGest foi hidrolisado com 10 µL de TFA 5% por 90 min à 37°C. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g durante 30 min à 6°C (MURAD et al., 2011). O sobrenadante contendo os peptídeos foi recuperado e secos sob vácuo por 4 horas. Estas foram ressuspendidas em 20 µL de formiato de amônio 20 mM contendo 200 fmol/µL de padrão interno (Fosforilase B de coelho, Waters Corp, Milford, MA) (GILAR et al., 2005; GEROMANOS et al., 2009; MURAD et al., 2011).

2.6 Identificação de proteínas por LC-MS/MS

As amostras foram separadas por cromatografia líquida de ultra desempenho pelo sistema nanoACQUITY™ (Waters Corporation, Manchester, UK) que possui duas colunas de fase reversa em *tandem* usando as concentrações graduais crescentes (10, 14, 16, 20, e 65%) de acetonitrila (ACN) (Sigma-Aldrich) para a liberação dos peptídeos. Para a obtenção dos espectros de massas foi utilizado o espectrômetro de massas modelo *Synapt G1 HDMS™ mass spectrometer* (Waters Corporation, Manchester, UK), utilizando *nanoelectrospray* como fonte de ionização e dois analisadores - quadrupolo e tempo de voo (nanoESI-QTOF, Waters). [Glu¹]- Fibrinopeptide B (GFB) foi utilizada como padrão para calibração de massa, sendo mensurada a cada 30 segundos. Quantidades iguais de peptídeos foram fracionados (1.900 ng) e três réplicas experimentais foram obtidas para cada amostra.

Os espectros de massas obtidos por NanoUPLC-MSE foram processados usando *ProteinLynx Global Server* (PLGS) versão 2.4 (Waters Corp, Milford, MA). Os dados brutos foram processados e comparados com banco de dados de *Paracoccidioides* spp. (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html) utilizando algoritmos previamente descritos (GEROMANOS et al, 2009, LI et al, 2009). Os parâmetros para identificação incluem: a) número mínimo de íons fragmentados por peptídeos (2); b) número mínimo de íons fragmentados por proteína (5); c) número mínimo de peptídeos por proteína (1); d) massa máxima para proteína (600 kDa); e) enzima escolhida para digestão: tripsina; f) modificação fixa: carbamidometilação de resíduos de cisteína; g) modificações variáveis: oxidação da metionina e fosforilação de STY; h) taxa de falso-positivo de 4%.

2.7 Caracterização *in silico* das Cu-proteínas

As metaloproteínas foram classificadas funcionalmente usando o catálogo de classificação Funcat2 presente no Pedant3 database (<http://www.pedant.gsf.de>). A localização celular foi obtida pelo WOLF PSORT um programa de predição da localização subcelular das proteínas (<http://www.wolfpsort.seq.cbrc.jp>), que cruza sequência de aminoácidos da proteína de interesse com aquelas armazenadas nos bancos de dados,

obtendo a localização celular por homologia. A localização celular com maior pontuação de compatibilidade foi aceita.

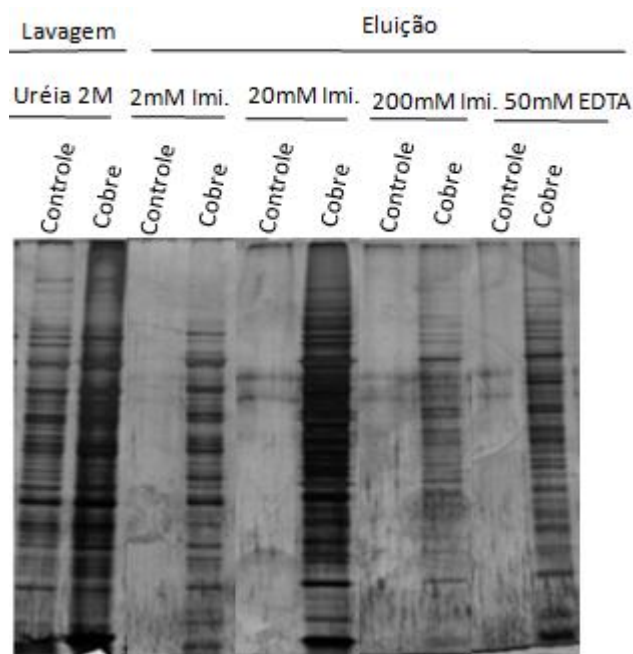
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Purificação das Cu-proteínas de *Paracoccidioides* spp.

As purificações de Cu-proteínas foram realizadas nas formas de levedura e micélio do isolado 01 e na forma de levedura do isolado 18. Com a finalidade de purificar proteínas com diferentes afinidades pelo metal, as moléculas ligadas foram eluídas com tampões que possuem força iônica diferentes. A uréia é usada como agente desnaturante, o imidazol é um agente competidor na fase móvel e o EDTA tem por finalidade romper a interação entre a proteína e o metal (BRESOLIN, MIRANDA, BUENO, 2009).

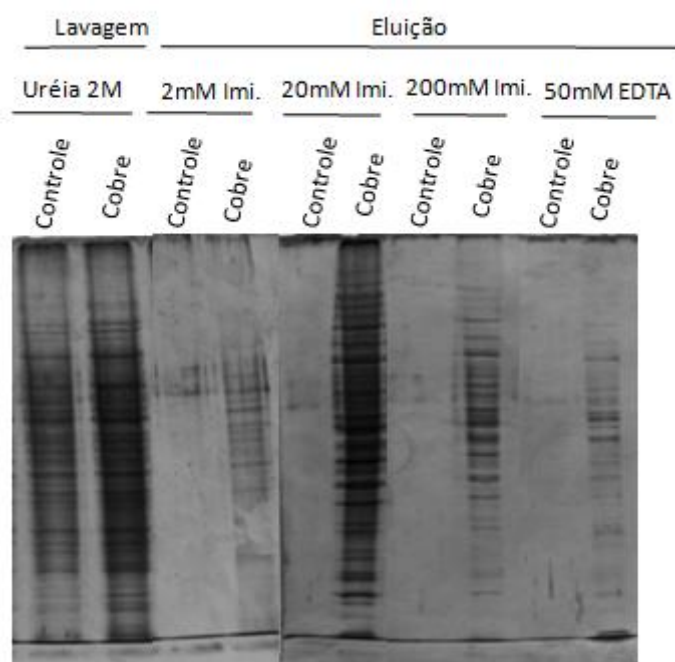
Observa-se que nas figuras 5, 6 e 7 há um perfil proteico semelhante dos tratamentos (Imidazol 2mM, 20mM, 200mM e EDTA 50mM). De acordo com as figuras 5 e 6 referentes ao isolado 01, foi observado que as proteínas ligantes a Cu foram eluídas em concentrações de imidazol de até 200 mM, indicando, portanto, a estabilidade de interação entre as proteínas e o metal cobre. Já que o tratamento do extrato proteico com diferentes concentrações de imidazol aumenta a força de dissociação do sistema, pois, este compete com sítios de ligação da proteína com o metal imobilizado. Observa-se também uma quantidade considerável de proteínas eluídas na condição de EDTA 50 mM, um quelante de metais, indicando que algumas proteínas ligantes de cobre são resistentes a imidazol e só são desfeitas com EDTA. Na figura 7, referente a cepa 18, observa-se similaridades às análises observadas para a cepa 01. Sendo que as proteínas micelianas do Pb18 ligantes a Cu, ainda estão em processo de purificação.

Figura 5. Purificação das proteínas ligantes de cobre de leveduras do *Paracoccidioides* sp. Pb01.



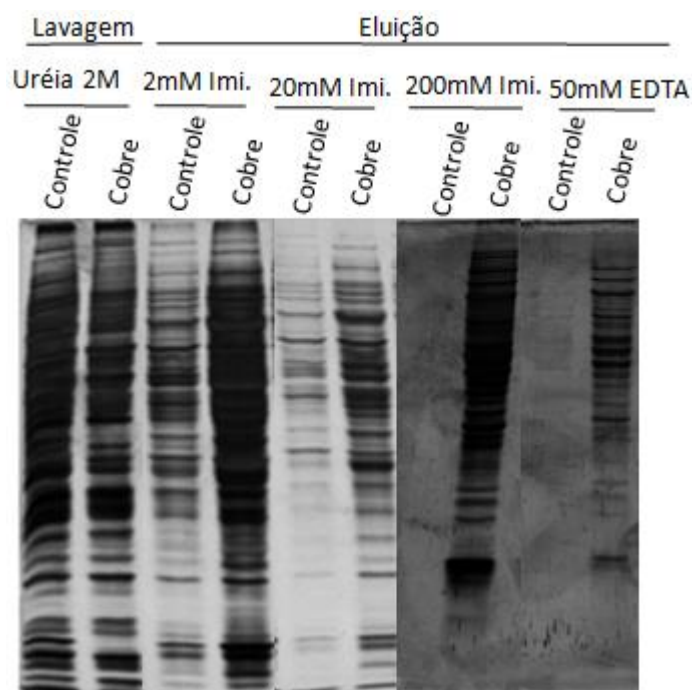
Após a ligação das proteínas ao Cu-IMAC as mesmas foram lavadas com Uréia 2M e eluídas em tampões com forças iônicas diferentes: Imidazol 2mM, Imidazol 20mM, Imidazol 200mM e EDTA 50mM. Os géis foram corados por prata.

Figura 6. Purificação das proteínas ligantes de cobre de micélios do *Paracoccidioides* sp. Pb01.



Após a ligação das proteínas ao Cu-IMAC as mesmas foram lavadas com Uréia 2M e eluídas em tampões com forças iônicas diferentes: Imidazol 2mM, Imidazol 20mM, Imidazol 200mM e EDTA 50mM. Os géis foram corados por prata.

Figura 7. Purificação das proteínas ligantes de cobre de leveduras do *Paracoccidioides* sp. Pb18.



Após a ligação das proteínas ao Cu-IMAC as mesmas foram lavadas com Uréia 2M e eluídas em tampões com forças iônicas diferentes: Imidazol 2mM, Imidazol 20mM, Imidazol 200mM e EDTA 50mM. Os géis foram corados por prata.

3.2 Identificação das proteínas ligantes a cobre

Para identificação, as proteínas leveduriformes do Pb01 obtidas nas quatro condições de tratamento por IMAC, foram então submetidas à análise de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS), de acordo com a metodologia utilizada por Sun et al., 2011. No total foram identificadas 600 proteínas leveduriformes (Pb01) ligantes a Cu. Em cada condição foi analisado o número de proteínas exclusivas, sendo que em Cu 2mM imidazol, Cu 20mM imidazol, Cu 200mM imidazol e Cu EDTA 50mM foram identificadas 90, 103, 14 e 75 proteínas, respectivamente. Enquanto, no controle foram identificadas em cada condição, 2mM imidazol, 20mM imidazol, 200mM imidazol e EDTA 50mM, 2, 5, 6 e 2 proteínas, respectivamente. Indicando, portanto, que a purificação apresentou baixos níveis de proteínas

não ligantes a cobre. As proteínas micelianas do Pb01 e leveduriformes do Pb18 ligantes a Cu ainda estão em processo de identificação.

Comparando a quantidade de proteínas preditas ligantes a cobre de *P. lutzii* por Tristão et al. (2015), no qual foram encontradas 26 proteínas Cu-dependentes com os dados obtidos nesse trabalho, sugere-se, portanto, que houve a identificação de novas Cu-proteínas, ao serem identificadas 600 Cu-proteínas.

3.3 Caracterização *in silico* das proteínas ligantes de cobre

As 600 Cu-proteínas da fase levedura (Pb01) foram classificadas funcionalmente com o intuito de elencar os possíveis papéis desempenhados pelo metal cobre (em associação com proteínas) no fungo. As classes funcionais encontradas, em ordem decrescente de abundância foram: endereçamento de proteínas, metabolismo, processamento do DNA, biossíntese de compostos, energia e resgate celular, como mostrado na figura 8. Entre essas proteínas ligantes a cobre de *Paracoccidioides* sp. identificadas, cerca de 80% apresentaram funções biológicas conhecidas, sendo o restante consideradas proteínas conservadas ou hipotéticas, sugerindo que ainda existam Cu-proteínas que exercem funções desconhecidas. Os resultados deste trabalho destacam endereçamento de proteínas como a função mais evidente exercida pelas Cu-proteínas. Esta é dividida em subcategorias de proteínas que realizam atividades de dobramento, estabilização, modificação e degradação de proteínas (WICKNER, MAURIZI, GOTTESMAN, 1999).

Uma das famílias de proteínas de endereçamento de proteínas é representada pelas chaperonas, que é subdividida em duas famílias: as chaperonas moleculares que estabilizam as proteínas parcialmente dobradas, impedindo, assim, a degradação destas, são representadas pelas Hsp70 (*heat shock proteins*); e as chaperoninas, que facilitam seu dobramento. Essa família exerce a atividade de dobramento da cadeia polipeptídica em sua estrutura tridimensional, após, esta ser emergida dos ribossomos. É evidente, portanto, que as moléculas de proteínas deve rapidamente dobrar em sua forma correta, para evitar que essas células gastem muito mais energia na síntese de

proteínas não-funcionais e na degradação de proteínas mal dobradas ou desdobradas (LODISH et al., 2002).

Outras proteínas pertencentes a função de endereçamento de proteínas é representada pelos proteossomos, um complexo de enzimas proteolíticas. Esse proteossomo atua sobre proteínas destinadas à digestão, que estão marcadas com a proteína ubiquitina. Além das proteínas ubiquitinadas, as desnaturadas, dobradas erroneamente ou que apresentam aminoácidos anormais, também são reconhecidas e consequentemente degradadas por esse sistema (ALBERTS et al., 2006). Após a identificação das proteínas, foi possível verificar que diversas proteínas que realizam o processo de ubiquitinação, são cobre-dependentes, tais como, PAAG_04901 enzima de conjugação de ubiquitina, PAAG_11074 proteína ubiquitina ribossômica 60S e PAAG_00204 enzima de conjugação de ubiquitina. Além, de várias proteínas pertencentes ao proteossomo serem também cobre-dependentes, tais como, PAAG_00852 componente proteossomo C1, PAAG_00866 componente proteossomo C5 e PAAG_03687 componente proteossomo PUP2.

Experimentos realizados por Gonçalves (2015) em *P. lutzii* mediante condições de deficiência de cobre, demonstrou um aumento no nível das proteínas de resposta ao choque térmico (HSPs), sugerindo que este pode estar relacionado com a atividade dessas proteínas como chaperonas. Pois, a privação de cobre, pode ocasionar um incorreto enovelamento de proteínas cobre-dependentes, onde estas poderiam se acumular no citoplasma. Foi observado também que houve um aumento da expressão da metalochaperona CCS que atua no transporte intracelular, esta chaperona de cobre para superóxido dismutase tem a função de repassar o cobre para a SOD (SCHIMIDT, RAMOS-GOMEZ, CULOTTA, 1999). Com as análises experimentais, foram identificadas várias proteínas de dobramento ligantes a Cu, entre estas: PAAG_07750 Hsp88, PAAG_07775 hsp75, PAAG_08059 hsp60, PAAG_08260 Hsp90 e PAAG_02116 Hsp70, sugerindo que o cobre exerce um papel fundamental na formação da estrutura nativa da proteína, através da função de dobramento proteico.

Algumas metaloproteínas identificadas nesse trabalho exercem um papel na virulência fúngica, como as Cu, Zn-SOD (PAAG_04164, PAAG_02725

e PAAG_02926). Visto que o sistema imunológico do hospedeiro produz ROS, sendo assim, a capacidade do patógeno de produzir essas moléculas antioxidantes determina o curso da infecção (SCANDALIOS, 2002; WONG et al., 2006; GILES et al., 2006; MIRBOD-DONOVAN et al., 2006).

O metabolismo foi a segunda função mais evidente exercida por essas metaloproteínas. De acordo com as análises proteômicas realizadas por Gonçalves (2015) sob limitação de cobre, demonstraram que houve um aumento da expressão de proteínas envolvidas com o metabolismo energético (via da glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico e via das pentoses fosfato), sugerindo que esses sejam possíveis mecanismos utilizados por *P. lutzii* para sobreviver durante depleção de cobre. Algumas proteínas identificadas nesse trabalho relacionadas a glicólise, foram: PAAG_01015 hexoquinase e PAAG_11169 enolase; ciclo do ácido tricarboxílico: PAAG_01725 succinato desidrogenase, PAAG_08449 malato desidrogenase, PAAG_08075 citrato sintase e PAAG_03447 acetil-CoA acetiltransferase, via das pentoses fosfato: PAAG_05146 ribose 5 fosfato isomerase, demonstrando que essas proteínas de metabolismo são essenciais para o desenvolvimento do fungo.

A localização celular das proteínas ligantes a Cu da fase de levedura (Pb01) foi obtida através do programa WOLF PSORT. A localização mais evidente foi a citoplasmática (~45%), seguida de (~20%) mitocondrial e (~15%) nuclear, como mostrado na figura 9. A citoplasmática foi a mais identificada, devido aos papéis desempenhados pelas proteínas e segundo Tristão et al. (2015), proteínas relacionadas com eventos metabólicos gerais são previstas para localizar no citoplasma, tais como, as proteínas relacionadas a glicólise e ao dobramento proteico.

Figura 8. Classificação funcional das proteínas leveduriformes do Pb01 ligantes a Cu identificadas nas quatro condições de tratamento.

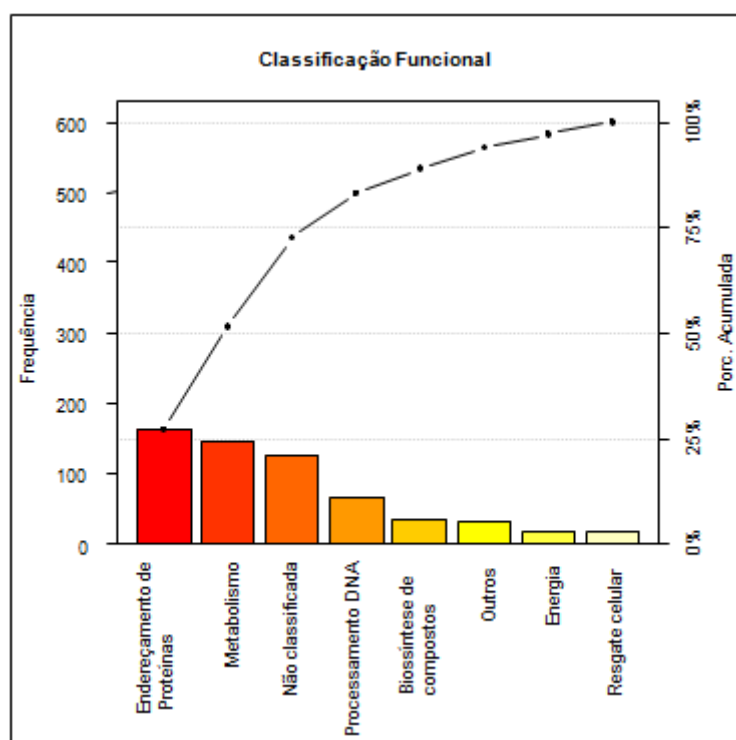
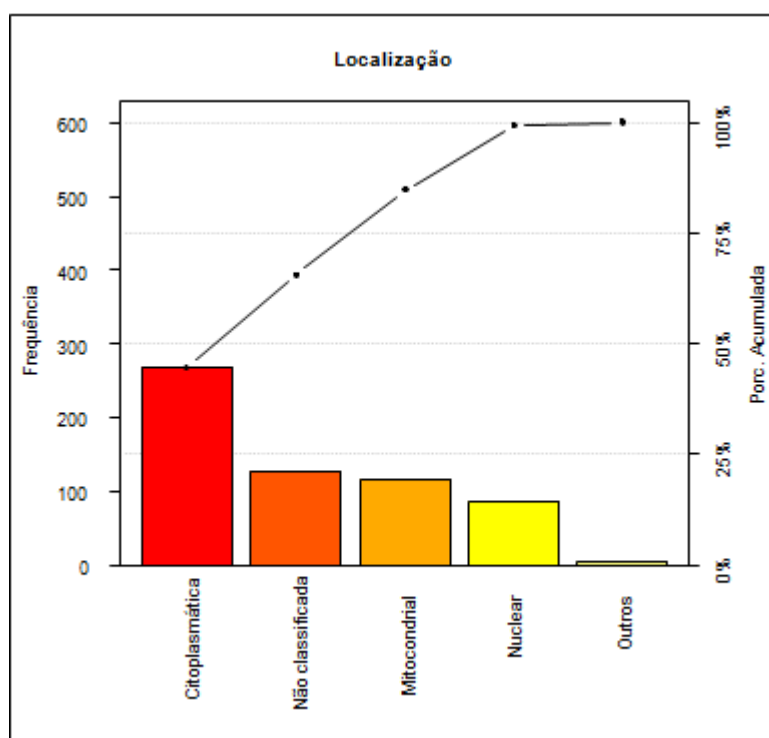


Figura 9. Localização celular das proteínas leveduriformes do Pb01 ligantes a Cu identificadas nas quatro condições de tratamento.



Experimentos análogos a esses referentes a identificação e caracterização de metaloproteínas de *S. pneumoniae* utilizando-se IMAC-MS com o cobre, foram realizados por Sun et al. (2011), no qual foi observado que proteínas ligantes a Cu exercem funções nos seguintes processos biológicos: (~30%) metabolismo de proteína, (~10%) metabolismo de nucleotídeos, (12%) metabolismo de carbono, (3%) metabolismo de aminoácido e peptídeo e (6%) ciclo celular e divisão celular. E a distribuição celular obtida para as proteínas ligantes a cobre foi: (~40%) no citoplasma. Sendo esses resultados semelhantes aos encontrados nas análises de bioinformática por Tristão et al. (2015) em *Paracoccidioides* spp., que demonstraram a função de metabolismo como uma das mais evidentes e a localização citoplasmática como a mais freqüente em Cu-proteínas. Comparando as análises de Tristão et al. (2015) com os resultados obtidos neste trabalho, percebe-se que o conhecimento sobre metaloproteínas de *Paracoccidioides* sp. ainda não está totalmente elucidado. Esses resultados apontam, portanto, que houve a caracterização de novas proteínas ligantes a cobre ao identificar endereçamento de proteínas como a função mais evidente.

4 CONCLUSÕES

Diante dessas observações foi possível verificar que:

1. As purificações apresentaram baixos níveis de proteínas não ligantes a cobre, pois, foram identificadas poucas proteínas nos controles. Isso sugere que as purificações foram bem sucedidas através da técnica de IMAC. As proteínas Cu-dependentes foram eluídas até na condição EDTA 50 mM, indicando, portanto, que a ligação entre algumas proteínas e o cobre é forte, pois, essas ligações só foram rompidas ao adicionar o agente quelante.
2. Cerca de 80% das proteínas leveduriformes ligantes a cobre de *Paracoccidioides* sp. identificadas apresentaram funções biológicas conhecidas, como endereçamento de proteínas e metabolismo. Enquanto 20% apresentaram domínios de ligação ao cobre, porém, com funções ainda desconhecidas.

3. Há uma alta frequência de proteínas citoplasmáticas, aproximadamente 45%, devido aos papéis que essas proteínas desenvolvem nos sistemas biológicos.
4. Algumas proteínas identificadas são relacionadas ao processo de virulência, sendo assim, essas contribuem para a patogenicidade fúngica.
5. Poucas proteínas identificadas estavam preditas como Cu-dependentes, indicando assim, que houve a identificação de novas proteínas com ligação a Cu.
6. A identificação e caracterização de cobre-proteínas obtidas neste trabalho podem contribuir para um melhor entendimento da interação patógeno-hospedeiro e essas podem ser novos alvos para terapia.

5 REFERÊNCIAS

- AJELLO, L.; POLONELLI. Imported paracoccidioidomycosis: a public health problem in non-endemic areas. **Eur J Epidemiol**, 1(3):160-5, 1985.
- ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da Biologia Celular**. 2ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- ALSPAUGH J. A. et al. *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein alpha subunit GPA1 and cAMP. **Genes Dev**, 11: 3206-3217, 1997.
- ANDREINI, C. et al. A hint to search for metalloproteins in gene banks. **Bioinformatics**, 20(9): 1373-1380, 2004.
- ANDREINI, C. et al. Occurrence of copper proteins through the three domains of life: a bioinformatic approach. **J. Proteome Res**, 7, 209-216, 2008.
- ARNESANO, F. et al. Characterization of the binding interface between the copper chaperone Atx1 and the first cytosolic domain of Ccc2 ATPase. **J. Biol Chem United States**, 41365-76, 2001.
- ARISTIZABAL, B. H. et al. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. **Med Mycol**, 40(2): 169-178, 2002.
- BAGAGLI, E. et al. 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**, (5): 344-351, 2006.

BARNETT, J. P. et al. Protein fractionation and detection for metalloproteomics: challenges and approaches. **Anal Bioanal Chem**, 402(10): 3311-3322, 2012.

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

BETTMER, J. Metalloproteomics: a challenge for analytical chemists. **Anal Bioanal Chem**, 383(3): 370-371, 2005.

BERTINI, I.; ROSATO, A. Bioinorganic chemistry in the postgenomic era. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100(7): 3601-3604, 2003.

BORKOW, G.; GABBAY, J. Copper as a biocidal tool. **Curr Med Chem**, 12:2163-2175, 2005.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal Biochem**, 72: 248-254, 1976.

BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais. **Química Nova (Impresso)**, v. 32, p. 1288-1296, 2009.

BROCK, M. Fungal metabolism in host niches. **Curr Opin Microbiol**, 2009.

BRUMMER, E. et al. Paracoccidioidomycosis: in update. **Clin. Microbiol**, 6:89-11, 1993.

CAMARGO, Z. P.; FRANCO, M. F. Current Knowledge on Pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev Iberoam Micol**, 17:41-48, 2000.

CARBONELL, L. M. Ultrastructure of dimorphic transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Bacteriol**, 100:1076-1082, 1969.

CARBONELL, L. M.; RODRIGUEZ, J. Transformation of Mycelial and Yeast Forms of *Paracoccidioides brasiliensis* in Cultures and in Experimental Inoculations. **J. Bacteriol**, 90, 504-510, 1965.

CARRERO, L. L. et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol**, 45(5): 605-612, 2008.

COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad. Saúde Pública**, 18: 1441-1454, 2002.

CVETKOVIC, A. et al. Microbial metalloproteomes are largely uncharacterized. **Nature**, 466(7307): 779-782, 2010.

DANCIS, A. et al. Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. **Cell**, 76(2):393-402, 1994.

DEGTYARENKO, K. Bioinorganic motifs: towards functional classification of metalloproteins. **Bioinformatics**, 16(10): 851-864, 2000.

DE MORAES, B. C.; SCHAFFER, G. M. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and an attempt to induce the dimorphic process with fetal calf serum. **Mycoses**, 45(5-6): 174-179, 2002.

DING, C. et al. *Cryptococcus neoformans* copper detoxification machinery is critical for fungal virulence. **Cell Host Microbe**, 13, 265–276, 2013.

DING, C. et al. The copper regulon of the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* H99. **Mol Microbiol**, 81:1560–1576, 2011.

DOLLWET H, S. Historic uses of copper compounds in medicine. **Trace elements in medicine**, 2:80–87, 1985.

EIDE, D. J. Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Nutr**, 133:1532S-1535S, 2003.

ESPÍRITO SANTO, C. et al. Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. **J. Appl Microbiol**, 77, 794–802, 2011.

FAVA-NETTO, C. **Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana com antígeno polissacarídeo**: 56. 1955.

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

FRANCO, M. F. et al. Paracoccidioidomycosis: a recent proposed classification of clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 20, n2, p.129-132, 1987.

FRANCO, M. et al. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Curr. Top. Med. Mycol**, 5:115-149, 1993.

GEORGASTOU, E. et al. The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. **J. Biol Chem**, 272: 13786-13792, 1997.

GEROMANOS, S. J. et al. The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LCMS/ MS. **Proteomics**, (9): 1683–1695, 2009.

GILAR, M. et al. Two-dimensional separation of peptides using RP- RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions. **J. Sep Sci**, (28): 1694–1703, 2005.

GILES, S. S. et al. The *Cryptococcus neoformans* catalase gene family and its role in antioxidant defense. **Eukaryot Cell**, 5(9): 1447-59, 2006.

GÓMEZ-ARIZ, J. L et al. Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems. **Analytica Chemical Acta**, v. 524, n.1-2, p. 15-22, 2004.

GONÇALVES, L. M. B. **Remodelamento metabólico de *Paracoccidioides lutzii* durante a privação de cobre determinado por análises proteômicas**. 2015. 126 f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Brasília. 2015.

HOCHULI, E. Large-scale chromatography of recombinant proteins. **J. Chromatogr**, 444, 293-302, 1988.

HODGKINSON, V.; PETRIS, M. J. Copper homeostasis at the host-pathogen interface. **J. Biol Chem**, v. 287, n.17, 13549-55, 2012.

KIM, B. E.; NEVITT, T.; THIELE, D. J. **Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation**. 2008.

LABBE, S.; ZHU, Z.; THIELE, D. J. Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. **J. Biol Chem**, (272): 15951-8, 1997.

LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology; Evolutionary cycle; Maintenance during Paprophytic Life; Biology; Virulence; Taxon. **In Paracoccidioidomycosis**, 13-25, 1994.

LACAZ, C. S. et al. *Paracoccidioides brasiliensis*. A mycologic and immunochemical study of two strains. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 41(2): 79-86, 1999.

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

LI, G. Z. et al. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. **Proteomics**, 9: 1696-1719, 2009.

LIN, X. et al. Virulence attributes and hyphal growth of *C. neoformans* are quantitative traits and the MATalpha allele enhances filamentation. **PLoS Genet**, 2(11):e187, 2006.

LODISH, H. et al. **Biologia Celular e Molecular**. 4ª Edição. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

LOBINSKI, R. et al. Imaging and speciation of trace elements in biological environment. **Biochimie**, 88(11): 1591-1604, 2006.

LONDERO, A. T.; RAMOS, T. C. D. Paracoccidioidomycosis: estudo clínico-micológico de 260 casos observados no interior do estado do Rio Grande do Sul. **Journal of Pulmonology**, v.16, p. 129-132, 1990.

MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol. Biol Evol**, 23(1): 65-73, 2006.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomicose. In **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**, SIDRIM, J. J. C, ROCHA, M. F. G. Eds. (Rio de Janeiro – RJ Brasil), 202-221, 2004.

MANLEY, S. A. et al. Simultaneous Cu-, Fe-, and Zn- specific detection of metalloproteins contained in rabbit plasma by size - exclusion chromatography – inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 14, p. 61-74, 2009.

MCEWEN, J. G. et al. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J. Med Vet Mycol**, 25(3): 165-175, 1987.

MIRBOD-DONOVAN, F. et al. Urease produced by *Coccidioides posadasii* contributes to the virulence of this respiratory pathogen. **Infect. Immun**, 74, 504-515, 2006.

MONTES-BAYON, M. et al. Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. **J. Chromatogr**, A 1000(1-2): 457-476, 2003.

MOREIRA, C. A. F. et al. **Genômica**. 5ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. Metallomics: the concept and methodology. **Chemical Society Reviews**, v.38, n.4, p.1119-1138, 2009.

MURAD, A. M. et al. Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MS(E). **J. Sep Sci**, 34(19), 2618–30, 2011.

NELSON, D. L; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NOYCE, J. O. et al. Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment. **J. Hosp Infect**, 63, 289–297, 2006.

OAKLEY, B.R., KIRSCH, D.R., MORRIS, N.R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.105, n.2, 361-3, 1980.

ONDERA, J.; OHSUMI, Y. Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. **J. Biol Chem**, 280: 31582-31586, 2005.

PAPANIKOLAOU, G.; PANTOPOULOS, K. Iron metabolism and toxicity. **Toxicol Appl Pharm**, 202, 199-211, 2005.

PEÑA, M. M. et al. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. **J. Biol Chem**, 275(43), 33244-51, 2000.

PERCIVAL, S. S. Copper and immunity. **J. Clin Nutr**, 67, 1064S–1068S, 1998.

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

PINZAN, C. F. et al. Immunological Basis for the Gender Differences in Murine *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. **PLoS One**, 5: 10757, 2010.

PORATH, J. IMAC – immobilized metal ion affinity based chromatography. **Trends Anal. Chem**, 7, 254, 1988.

PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 104(3): 513-521, 2009.

PUIG, S. et al. Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. **J. Biol Chem**, 26021-26030, 2002.

RESTREPO-MORENO, A. Infections agents and pathogenesis. In: **MURPHY, J. W.; FRIEDMAN, H.; BENDINELLI, M.**, eds. Fungal infections and immune responses. New York, London: Plenum Press. Cap.10, 251-276, 1993.

RESTREPO, A. Immune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* in human and animal hosts. In **Current Tropcs in Medical Mycology**, M.G.M, ed. (New York, Springer-Verlag), p. 239-277, 1988.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, 23, 323-334, 1985.

RICHIE, D. L.; ASKEW, D. S. Autophagy a role in metal ion homeostasis?. **Landes Bioscience**, 4:1, 115-117, 2008.

ROONEY, P. J.; KLEIN, B. S. Linking fungal morphogenesis with virulence. **Cell Microbiol**, 4(3): 127-137, 2002.

ROWLAND, J. L., NIEDERWEIS, M. Resistance mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* against phagosomal copper overload. **Tuberculosis**, 92, 202–210, 2012.

RUTHERFORD, J. C.; BIRD, A. J. **Metal - Responsive Transcription Factors That Regulate Iron, Zinc, and Copper Homeostasis in Eukaryotic Cells**, 2004, vol. 3, n1, 1-13, 2004.

SANDEGREN, L. et al. Transfer of an *Escherichia coli* ST131 multi resistance cassette has created a *Klebsiella pneumonia* - specific plasmid associated with a major nosocomial outbreak. **J. Antimicrob.Chemother.** 67, 74–83, 2012.

SANO, A. et al. The Research Encouragement Award. Effects of sex hormones on sexual difference of experimental paracoccidioidomycosis. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, 40, 1-8, 1999.

SAMANOVIC, M. I. et al. Copper in microbial pathogenesis: meddling with the metal. **Cell Host Microbe**, 11(2): 106–115, 2012.

SANZ-MEDEL, A. From metalloproteomics to heteroatom-tagged proteomics. **Anal Bioanal Chem**, 381(1): 1-2, 2005.

SAITOH, Y. et al. A copper-transporting ATPase BcCCC2 is necessary for pathogenicity of *Botrytis cinerea*. **Mol. Genet Genomics**, (284): 33–43, 2010.

SHANKAR, J. et al. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. **Clin Microbiol**, Rev 24, 296-313, 2011.

SCANDALIOS, J. G. The ROS. **Trends Biochem Sci**, 27 – 483-486, 2002.

SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. Iron and microbial infection. **Nat. Rev. Microbiol**, 2, 946–953, 2004.

SCHMIDT, P. J.; RAMOS-GOMEZ, M.; CULOTTA, V. C. A gain of superoxide dismutase (SOD) activity obtained with CCS, the copper metallochaperone for SOD1. **J. Biol Chem**, 274, 36952-6, 1999.

SHI, W.; CHANCE, M. R. Metallomics and metalloproteomics. **Cell Mol Life Sci**, 65(19): 3040-3048, 2008.

SHI, W. et al. Metalloproteomics: forward and reverse approaches in metalloprotein structural and functional characterization. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.15, n.1, p. 144-148, 2011.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, 39, 297-310, 2006.

SHOEB, E. et al. Horizontal gene transfer of stress resistance genes through plasmid transport. **World J. Microbiol Biotechnol**, 28, 1021–1025, 2012.

SILVA, M. G. et al. The homeostasis of iron, copper and zinc in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* var. *grubi*, and *Cryptococcus gatii*: a comparative analysis. **Front Microbiol**, 2: 1-12, 2011.

SUN, X. et al. Putative copper- and zinc- binding motifs in *Streptococcus pneumoniae* identified by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry. **Proteomics**, 11(16): 3288-3298, 2011.

SUTTLE, N. F.; JONES, D. G. Recent Developments in Trace Element Metabolism and Function: Trace Elements, Disease Resistance and Immune Responsiveness in Ruminants¹. **J. Nutr**, 119, 1055–1061, 1989.

SULKOWSKI, E. Immobilized metal ion affinity chromatography of proteins on IDA – iron³⁺. **Macromol. Chem. Macromol. Symp**, 17, 334, 1988.

SZPUNAR, J. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. **Analyst**, v. 130, n. 4, 442-465, 2005.

TEIXEIRA, M. D. et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Med Mycol**, 2013.

TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol**, 52(2): 273-283, 2009.

THIELE, D. J. ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. **Mol Cell Biol**, 8, 2745-52, 1988.

THEIL, E. C.; EISENSTEIN, R. S. Combinatorial mRNA regulation: iron regulatory proteins and iso-iron-responsive elements (Iso-IRES). **J. Biol Chem**, 275: 40659-40662, 2000.

TRISTÃO, G. B. et al. Predicting copper-, iron-, and zinc- binding proteins in pathogenic species of the *Paracoccidioides* genus. **Front Microbiol**, vol 5: 1-11, 2015.

UNTEREINER, W. A. et al. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia**, 96(4): 812-821, 2004.

VALLERA, E. T. et al. Fungal infection by *Paracoccidioides brasiliensis* mimicking bone tumor. **Pediatr Blood Cancer**, 2008.

VERBI, F. M. et al. Metal-binding proteins scanning and determination by combining gel electrophoresis, synchrotron radiation X-ray fluorescence and atomic spectrometry. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.62, 97-109, 2005.

VILLAR, L. A. et al. 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, 1988.

WALTON, F. J. et al. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, 57:1381–1396, 2005.

WARD, S. K. et al. The global responses of *Mycobacterium tuberculosis* to physiological levels of copper. **J. Bacteriol**. 190, 2939–2946, 2008.

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

WEINBERG, E. D. Iron availability and infection. **Biochim Biophys**, 1790, 600–605, 2009.

WICKNER, S.; MAURIZI, M. R.; GOTTESMAN, S. Posttranslational Quality Control: Folding, Refolding, and Degrading Proteins. **Science**, v. 286, 1888-93, 1999.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. 7^a ed, 2010.

WOOD L. K.; THIELE, D. J. Transcriptional activation in yeast in response to copper deficiency involves copper-zinc superoxide dismutase. **J. Biol Chem**, vol. 404-13, 0021-9258, 2008.

WOLSHENDORF, F. et al. Copper resistance is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc Natl Acad Sci**, 1621-6, 2011.

WONG, J. **Sep. Purif. Methods**, 20-49, 1991.

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

YANNONE, S. M. et al. Metals in biology: defining metalloproteomes. **Curr Opin Biotechnol**, 23(1): 89-95, 2012.

YASMIN, S. et al. The interplay between iron and zinc metabolism in *Aspergillus fumigatus*. **Fungal Genet Biol**, 46(9): 707-713, 2009.

ZHU, X.; WILLIAMSON, P. R. A. CLC-type chloride channel gene is required for laccase activity and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, 50:1271–1281, 2003.